

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**DETERMINACIÓN MEDIANTE SIMULACIÓN DE
DINÁMICA MOLECULAR, DE LA INFLUENCIA DE LA
TEMPERATURA EN LA POLCALCINA PHL P 7
PRESENTE EN MAÍZ (ZEA MAYS) RESPECTO A SU
FORMA AISLADA E INTERACTUANTE CON LA IGE.**

Tesis presentada por la Bachiller:
Ayqui Cueva, Flor Avelina
Para optar al título profesional de:
Ingeniera Biotechnóloga

Asesor:
Dr. Gómez Valdez, Badhin

Arequipa – Perú
2022

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 08 de Diciembre del 2021

Dictamen: 005560-C-EPIB-2021

Visto el borrador del expediente 005560, presentado por:

2013220432 - AYQUI CUEVA FLOR AVELINA

Titulado:

DETERMINACIÓN MEDIANTE SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR, DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA POLCALCINA PHL P 7 PRESENTE EN MAÍZ (ZEA MAYS) RESPECTO A SU FORMA AISLADA E INTERACTUANTE CON LA IGE.

Nuestro dictamen es:

APROBADO

0838 - CARDENAS GARCIA JAIME DANTE
DICTAMINADOR



2781 - BARREDA DEL CARPIO JAIME ERNESTO
DICTAMINADOR



3060 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL
DICTAMINADOR

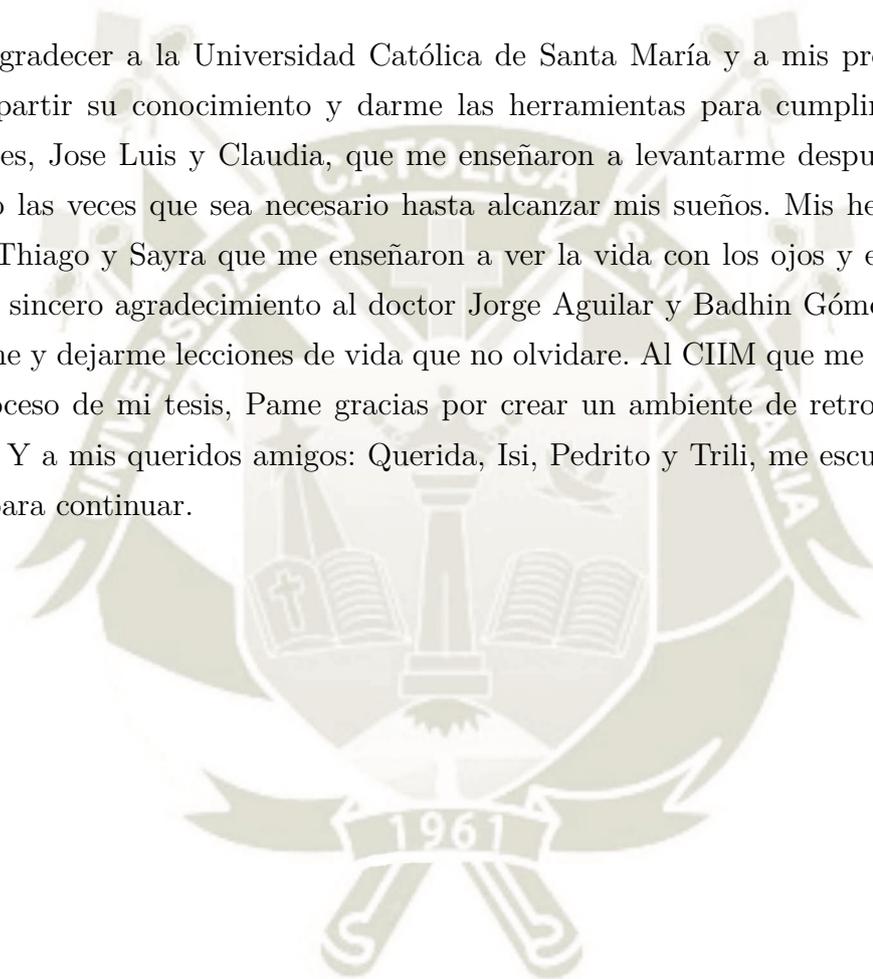


Dedicatoria

Hace mucho tiempo escuche a Anthony De Mello decir que la vida es una sinfonía y creo que no puedo estar más de acuerdo con él. Somos notas. Notas, sin las que no podría haber sinfonía. Notas indispensables para que suene esta maravilla. Las notas tienen ritmo y melodía. Las hay corcheas y negras. Las hay fusas y blancas. Las hay que duran y duran, como las redondas, pero las hay livianas, casi imperceptibles, a las que llamamos fusas o semicorcheas, creo que para que llegue a este punto de mi vida hubo muchas notas que intervinieron para que sonara esta canción llamada universidad y para finalizar con broche de oro tiene que sonar la melodía de la tesis. Cada nota musical significa cada persona que intervino en mi vida y que sin ellas estaría incompleta esta sinfonía, creo que no es necesario citar a cada una de ellas ya que si leyeron mi dedicatoria es signo de que fue una nota esencial en la sinfonía de mi vida.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad Católica de Santa María y a mis profesores, gracias por compartir su conocimiento y darme las herramientas para cumplir mis sueños. A mis padres, Jose Luis y Claudia, que me enseñaron a levantarme después de una caída y hacerlo las veces que sea necesario hasta alcanzar mis sueños. Mis hermanos: Gloria, Jeremy, Thiago y Sayra que me enseñaron a ver la vida con los ojos y el corazón de un niño. Un sincero agradecimiento al doctor Jorge Aguilar y Badhin Gómez; por guiarme, enseñarme y dejarme lecciones de vida que no olvidare. Al CIIM que me escuchó y apoyó en el proceso de mi tesis, Pame gracias por crear un ambiente de retroalimentación en el CIIM. Y a mis queridos amigos: Querida, Isi, Pedrito y Trili, me escucharon y dieron ánimos para continuar.



Glosario

1. Alérgeno: Es una sustancia que puede inducir una reacción de hipersensibilidad (alérgica) en personas y animales susceptibles que han estado en contacto previamente con él.
2. Alergia: Es una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos específicos, puede ser mediada por anticuerpos o mediada por células.
3. CDR (“Complementary Determining Region”): Superficie de la región variable de un anticuerpo o receptor de célula T, que se une al antígeno.
4. Epitopo: estructura de un antígeno (fragmento de un antígeno) que es reconocido por un receptor antigénico (anticuerpo o receptor sobre la superficie de la célula T).
5. Inmunoglobulina E (IgE): Es un tipo de anticuerpo (o isotipo de inmunoglobulina) presente únicamente en mamíferos. Está implicada en la alergia (reacciones del tipo I de hipersensibilidad).

Resumen

La proteína *Phl p 7* es una de las polcalcinas mejor caracterizadas con respecto a la reactividad cruzada entre la IgE y su estructura tridimensional, ya que posee la mayor cantidad de epítomos. En el presente trabajo se ha hecho un estudio *in silico* investigando las diferentes interacciones de unión entre la *Phl p 7* de *Zea Mays* sometida a diferentes temperaturas (17 °C, 37 °C, 57.9 °C, 77.3 °C y 97.3 °C) y un fragmento de unión a antígeno (Fab) adoptando dinámica molecular (DM). Con el objetivo de dilucidar los detalles moleculares de esta polcalcina se realizaron diferentes DM a 500 ns únicamente de la *Phl p 7* a las diferentes temperaturas mencionadas anteriormente. Después se procedió a hacer un acoplamiento molecular entre las estructuras resultantes de la *Phl p 7* después de las DM y la región Fab. Obteniendo como resultado 10 diferentes estructuras cuaternarias, basados en datos como la energía global, área de interfaz y penetración de la *Phl p 7* dentro del sitio de complementariedad (CDR). A continuación, se realizaron diferentes DM de 100 ns para estas 10 diferentes estructuras cuaternarias a condiciones fisiológicas (37 °C y 1 bar). La energía libre de enlace se evaluó con la mecánica molecular de área superficial de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA). Se utilizó este método para evaluar la variación de la afinidad de la *Phl p 7* después de haber sido sometida a diferentes temperaturas. Nuestros resultados muestran que a pesar de haber sometido a la polcalcina a altas temperatura como a 77.3 °C presentó varias características óptimas para que se de una reacción espontánea de unión entre la *Phl p 7* y el CDR. También sucedió esto con la estructura de la *Phl p 7* después de someterla a 17 °C. Los resultados muestran que la *Phl p 7* presenta una alta termoestabilidad y una estructura con varios epítomos, lo que conlleva a que se de una gran probabilidad de desencadenar una alergia mediada por IgE.

Palabras claves

Polcalcina, Inmunoglobulina E, temperatura, dinámica molecular.

Abstract

The protein *Phl p 7* is one of the best characterized polcalcins with respect to the cross-reactivity between IgE and its three-dimensional structure, since it has the highest number of epitopes. In the present work an *in silico* study has been carried out investigating the different binding interactions between the *Phl p 7* of *Zea Mays* subjected to different temperatures (17 °C, 37 °C, 57.9 °C, 77.3 °C and 97.3 °C) and an antigen-binding fragment (Fab) adopting molecular dynamics (DM). In order to elucidate the molecular details of this polcalcine, different DM were made at 500 ns only of the *Phl p 7* at the different temperatures mentioned above. Afterwards, a molecular coupling was made between the resulting structures of the *Phl p 7* after the DM and the Fab region. Obtaining as a result 10 different quaternary structures, based on data such as global energy, interface area and penetration of *Phl p 7* within the complementarity site (CDR). Next, different DMs of 100 ns were made for these 10 different quaternary structures at physiological conditions (37 °C and 1 bar). The free energy of binding was evaluated with the molecular mechanics of surface area of Poisson-Boltzmann (MM/PBSA). This method was used to evaluate the variation in the affinity of *Phl p 7* after being subjected to different temperatures. Our results show that despite having subjected the polcalcine to high temperatures such as 77.3 °C, it presented several optimal characteristics for a spontaneous union reaction between the *Phl p 7* and the CDR. This also happened with the structure of *Phl p 7* after subjecting it to 17 °C. The results show that *Phl p 7* presents a high thermostability and presents a structure with several epitopes, which leads to a high probability of triggering an IgE-mediated allergy.

Keywords

Polcalcine, Immunoglobulin E, temperature, molecular dynamics.

Contenido

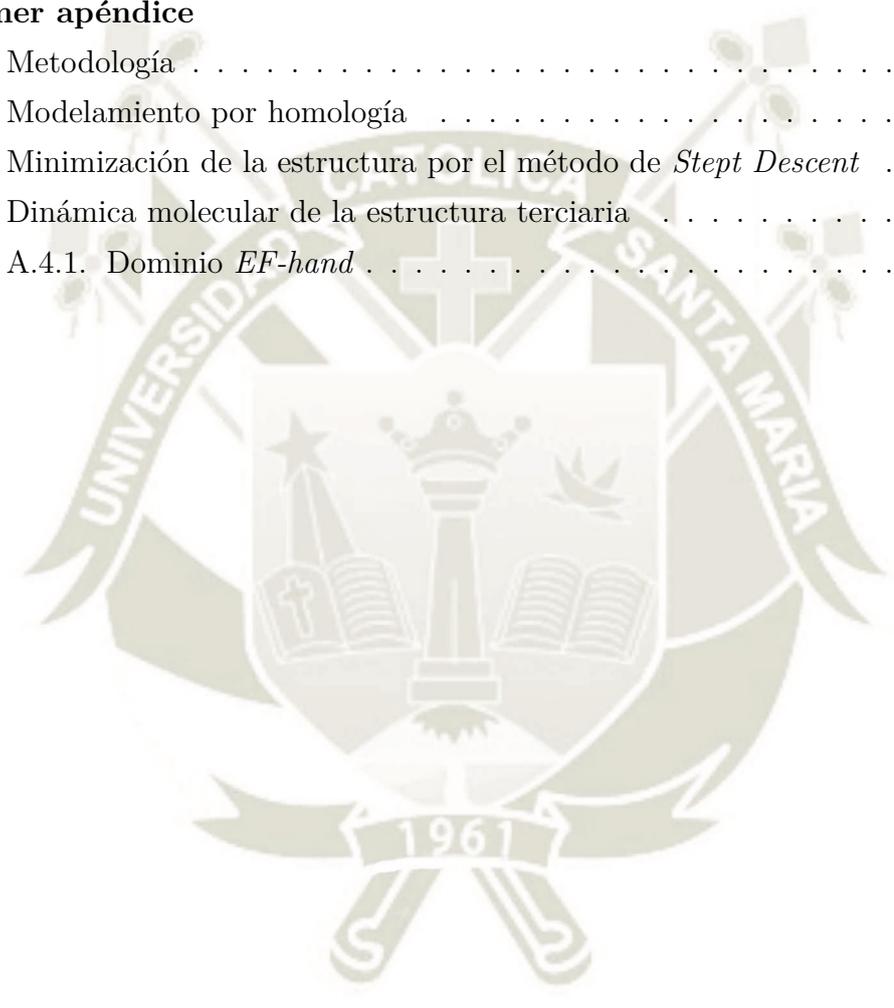
Glosario	i
Resumen	ii
Abstract	iii
Contenido	iv
Introducción	1
Hipótesis	3
Objetivos	4
Capítulo I	5
1. Marco Teórico	5
1.1. Alergia	5
1.1.1. Definición	5
1.1.2. Mecanismo de daño tipo I	6
Activación de linfocitos Th2	6
IgE/ Receptores	7
1.1.3. Inmunoglobulina E	8
1.1.4. Alérgeno	10
1.1.5. Alergenicidad	11
1.2. Polinosis	12
1.2.1. Definición	12
1.2.2. Rinitis alérgica y asma en el Perú	13
1.2.3. Polen	13
Definición	13

Polen como transportador de alérgenos	15
Propiedades de los alérgenos polínicos	16
1.3. Proteínas de unión al calcio como alérgenos	17
1.3.1. Polcalcinas	18
1.4. <i>Phl p 7</i>	19
1.4.1. Importancia de la <i>Phl p 7</i>	20
1.5. Maíz en el Perú	21
1.5.1. Condiciones medio ambientales y espaciales	21
1.6. Biología computacional: Simulación molecular de proteínas	22
1.6.1. Biología computacional	22
1.6.2. Modelado de proteínas	22
Introducción	22
Método	23
1.6.3. Herramientas bioinformáticas	24
Protein Data Bank	24
Visualización de estructuras tridimensionales	25
1.6.4. Dinámica molecular	25
Introducción	25
Mecánica molecular	25
Simulación de Dinámica molecular	27
1.6.5. Ensamble molecular	30
Docking molecular	31
Componente estructural	31
Componente energética	32
Aproximación de Poisson-Boltzmann en el cálculo de energías libres (MM/PBSA)	33
Capítulo II	35
2. Metodología	35
2.1. Detalles Computacionales	35
2.1.1. Hardware	35
2.1.2. Base de datos	35
NCBI	35
PDB	35
UniProt	36

2.1.3.	Software	36
	GROMACS 2020.3	36
	UCSF Chimera	36
	Molden	36
	VMD	37
	LigPlot	37
	PuTTY	37
	WinSCP	37
	ConTEXT	37
	APBS	37
2.1.4.	Servidores	38
	I-TASSER	38
	PDBsum	38
	ProSA-web	38
	ElliPro	38
	PatchDock	39
	FireDock	39
2.2.	Descriptores de estructura	39
	2.2.1. Diagrama de Ramachandran	39
	2.2.2. Puntuación Z	39
	2.2.3. Gráfico de puntuaciones de residuo	40
2.3.	Metodología	40
	2.3.1. Modelado de la estructura terciaria de la proteína	40
	2.3.2. Análisis de la estructura obtenida de la homología	40
	2.3.3. Simulación de dinámica molecular	41
	2.3.4. Acoplamiento molecular	42
	2.3.5. Simulación de dinámica molecular de las estructuras cuaternarias	43
	2.3.6. Análisis de energías por la metodología de MM/PBSA	43
Capítulo III		45
3. Resultados y Discusión		45
3.1.	Estructura de la Phl p 7 específica de <i>Zea mays</i>	45
	3.1.1. Estructura de la proteína	45
	Estructura primaria	45
	Estructura secundaria	46

Dominio <i>EF-hand</i>	48
Estructura terciaria	50
3.1.2. Análisis de la estructura final obtenida	51
Diagrama de Ramachandran	51
ProSA-Web	52
3.2. Minimización de la estructura por el método de <i>Steepest Descent</i>	53
3.2.1. Estructura secundaria	53
Hoja β	54
Hélice α	55
Giro β	55
Giro γ	56
3.2.2. Dominio <i>EF-hand</i>	56
3.2.3. Estructura terciaria	58
3.2.4. Análisis de la estructura minimizada obtenida	59
Diagrama de Ramachandran	59
ProSA-Web	60
3.3. Dinámica molecular de la <i>Phl p 7</i>	61
3.3.1. Estructura secundaria	61
3.3.2. Dominio <i>Ef-hand</i>	63
Primer bucle	63
Segundo bucle	68
3.3.3. Estructura terciaria	73
3.3.4. Epítomos	80
3.4. Acoplamiento molecular	82
3.4.1. Inmunoglobulina E	82
3.4.2. 17°C - 290.15 K	83
3.4.3. 37 °C - 310.15 K	85
3.4.4. 57.9 °C - 331.05 K	87
3.4.5. 77.3 °C - 350.45 K	89
3.4.6. 97.3 °C - 370.45 K	91
3.5. Dinámica molecular de estructuras cuaternarias	93
3.5.1. 17°C - 290.15 K	94
3.5.2. 37 °C - 310.15 K	98
3.5.3. 57.9 °C - 331.05 K	101
3.5.4. 77.3 °C - 350.45 K	106
3.5.5. 97.3 °C - 370.45 K	110

Capítulo IV	115
4. Conclusiones	115
Recomendaciones	118
Referencias Bibliográficas	119
A. Primer apéndice	127
A.1. Metodología	128
A.2. Modelamiento por homología	132
A.3. Minimización de la estructura por el método de <i>Steept Descent</i>	135
A.4. Dinámica molecular de la estructura terciaria	137
A.4.1. Dominio <i>EF-hand</i>	137



Introducción

Actualmente casi el 20 % de la población de los países industrializados sufre de alergia tipo I^{1,2}. Este mecanismo es el que se observa comúnmente en las enfermedades alérgicas como rinitis o asma, donde los antígenos se denominan alérgenos. De acuerdo a la clasificación de Gell y Coombs, esta respuesta corresponde a un mecanismo de daño mediado por linfocitos TH2 e inmunoglobulina E (IgE), también conocida como respuesta de hipersensibilidad inmediata³. Un conocimiento detallado sobre la naturaleza molecular de los antígenos es relevante para el diagnóstico de las enfermedades, prevención y tratamiento de este tipo de alergia.

La reactividad cruzada es un tipo de reacción alérgica muy común dentro del reino vegetal y es causada mayormente por tres familias de panalérgenos ampliamente distribuidos: las profilinas, las proteínas de unión al calcio (CBP) y las proteínas de transferencia de lípidos no específicos. Las CBP muestran una gran diversidad de propiedades, composición, estructura, unión al calcio e interacción. Al menos tres tipos de CBP alérgicos *EF-hand* se expresan en el tejido polínico: las que contienen dominios de unión al calcio *2EF-hand*, las *3EF-hand* y las *4EF-hand*⁴.

Los alérgenos de unión al calcio con dominio *2EF-hand*, mencionados anteriormente, son de bajo peso molecular (8 a 25 kD). En su mayoría son proteínas ácidas que se liberan rápidamente después de la hidratación del polen. Un ejemplo de estas proteínas son las *Bet v 4*, *Alg n 4* de los árboles, *Cyn d 7* y *Phl p 7* de los pastos, y los CBPs de malezas: *Bra n 1*, *Bra n 2*, *Bra r 1* y *Bra r 2*⁴.

La proteína *Phl p 7* es una de las polcalcinas mejor caracterizadas con respecto a la reactividad cruzada entre la IgE y su estructura tridimensional⁵⁻⁷. A pesar de presentar una baja prevalencia de reconocimiento de IgE (10 %), ésta mostró una actividad alérgica elevada⁵.

Se ha estudiado la *Phl p 7* de la variedad de pasto *Phleum pratense* pero no la variedad contenida en el *Zea Mays*. Al ser la polcalcina con mayor número de epítomos y alta reactividad cruzada, es fundamental dilucidar los detalles moleculares de esta polcalcina presente en el maíz, ya que actualmente se encuentra entre uno de los productos de mayor

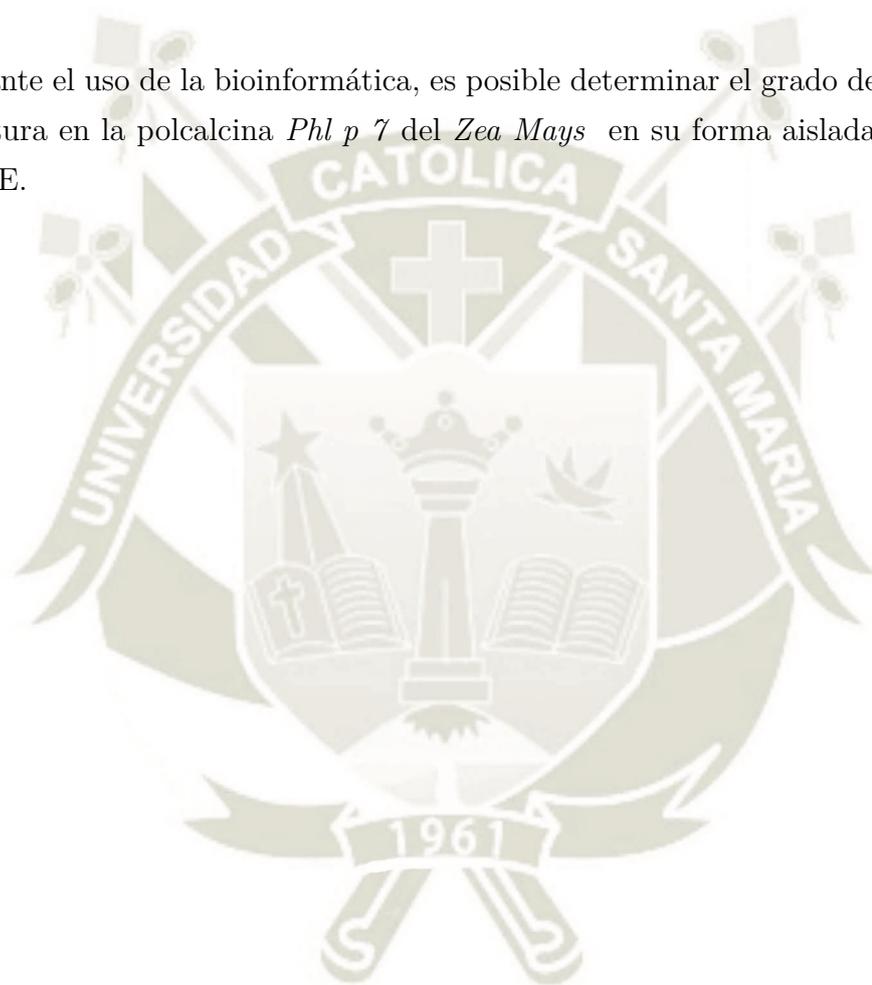
importancia en el mundo puesto que es un cultivo dinamizador de la economía local, regional y nacional. Dado que la producción de maíz se incrementa directamente con el transcurso de los años, una de las consecuencias sería el incremento de la concentración de este tipo de polcalcina en el ambiente lo que derivaría en un aumento de casos de hipersensibilidad tipo I.

La alta alergenicidad en el primer contacto con los granos de polen es debida a la elución rápida de éstos después de la hidratación en la zona de contacto húmeda en el cuerpo humano, así como la alta estabilidad y capacidad de replegamiento de las proteínas, entre las que se encuentra la *Phl p 7*^{8,9}. Ésta parece contener la mayoría de los epítomos relevantes reconocidos por la IgE presentes en otras familias de alérgenos que se unen al calcio (reactividad cruzada)¹⁰. Existe un estudio que menciona que la IgE de los pacientes sensibles a las polcalcinas reconocen más a aquellas que presentan el calcio en su estructura que a las polcalcinas en su forma agotada de calcio¹¹. Debido a estos hechos, Raith *et al.* consideraron a la *Phl p 7* como un candidato para generar una variante hipoalergénica que podría usarse para inmunoterapia de individuos sensibilizados a polcalcina¹². Otro hecho importante es que se conoce que la *Phl p 7* unida al calcio presenta una gran estabilidad térmica como muchas otras proteínas de su tipo¹³.

En este trabajo de tesis se presentan los resultados obtenidos de nuestros estudios *in silico* sobre los detalles moleculares de la estructura de la polcalcina *Phl p 7* específica de la especie *Zea Mays*. Este estudio se realizó tomando en cuenta diferentes temperaturas, además de que analizamos el papel que cumple el calcio en su estructura y estabilidad térmica. Como trabajo adicional hemos realizado cálculos de energía libre para dilucidar su afinidad energética con la inmunoglobulina E.

Hipótesis

Mediante el uso de la bioinformática, es posible determinar el grado de influencia de la temperatura en la polcalcina *Phl p 7* del *Zea Mays* en su forma aislada e interactuante con la IgE.



Objetivos

Objetivo General

- Determinar mediante simulaciones de dinámica molecular la influencia de la temperatura en la estabilidad estructural de la polcalcina *Phl p 7* presente en el maíz (*Zea Mays*), para finalmente hacer un estudio de su forma aislada e interactuante con la IgE.

Objetivos Específicos

- Obtener la estructura terciaria de la *Phl p 7* específica del *Zea mays*.
- Optimizar la geometría de nuestra estructura mediante el método de *Steepest Descent* y hacer un posterior análisis.
- Efectuar la dinámica molecular de nuestras estructuras terciarias a las diferentes temperaturas a evaluar.
- Realizar un análisis de los datos obtenidos después de la dinámica molecular usando como indicadores a los diagramas de RMSF, RMSD, Rg, enlaces de hidrógeno y epítomos.
- Llevar a cabo un acoplamiento molecular de las estructuras terciarias, para estudiar la interacción de la IgE con la *Phl p 7*.
- Efectuar la dinámica molecular de estructuras cuaternarias.
- Usar la metodología MM/PBSA para la obtención y análisis de energías libres de interacción entre la *Phl p 7* obtenida a las diferentes temperaturas y la IgE.

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1. Alergia

1.1.1. Definición

Para dilucidar los objetivos planteados en este trabajo de tesis es necesario comprender la terminología utilizada y los mecanismos que implican éstos. Se ha observado que existe una confusión en la terminología usada al referirse a los términos de alergia, atopía e hipersensibilidad para caracterizar las reacciones alérgicas. Si no hay un entendimiento común y un uso estricto de los términos para definir las enfermedades alérgicas en el ámbito clínico y científico, puede haber confusiones al momento de reportar nuevas investigaciones, lo que derivaría en una inadecuada atención a los pacientes.

Para solventar este problema, se realizó una revisión de información basada en el mecanismo con el cual inician las reacciones alérgicas, las cuales generalmente son de carácter inflamatorio y causan los síntomas y signos de la alergia. Estos síntomas son también comunes de otros cuadros clínicos por lo que es de gran importancia que el paciente, el médico o el investigador comprendan el mecanismo de inicio de un cuadro alérgico. No hacerlo puede llevar a diagnósticos incorrectos, tratamientos inapropiados que pueden ser ineficaces o hasta peligrosos para el paciente.

Se establece que el término hipersensibilidad se debe usar para describir síntomas o signos objetivos y reproducibles iniciados por la exposición a estímulos definidos a una dosis tolerada por personas normales. Se define como alergia aquella reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos específicos, que puede ser mediada por anticuerpos o por células. Cuando el anticuerpo pertenece al isotipo inmunoglobulina E (IgE), se habla de alergia mediada por IgE. En la mayoría de pacientes, el anticuerpo típicamente responsable de una reacción alérgica pertenece al isotipo IgE y se puede decir

que estos pacientes sufren este tipo de alergia¹⁴. En el contexto de una reacción inmunológica, el desencadenante se denomina antígeno. Por otro lado, según la EAACI¹⁵, el término atopía es una tendencia personal y / o familiar que se adquiere generalmente en la infancia o la adolescencia, a sensibilizarse y producir anticuerpos IgE en respuesta a exposiciones ordinarias a los alérgenos, generalmente proteínas. Como consecuencia, estas personas pueden desarrollar síntomas típicos de asma, rinoconjuntivitis o eccema. Por lo tanto, Johansson *et al.* sugieren que el término de atopía debería reservarse para describir la predisposición genética a volverse sensibles a IgE en respuesta a la exposición a sustancias que generalmente son toleradas por la mayoría de la población expuesta a los alérgenos.

Generalmente lo que se da en nuestros cuerpos son las respuestas inmunes normales, tanto celulares como humorales. Estas respuestas permiten que se de el reconocimiento entre las células endógenas y la eliminación de patógenos. Cuando estas respuestas son exageradas o se producen frente a sustancias normalmente inocuas, gatillan enfermedades, y se les denominan mecanismos de daño o mecanismos de hipersensibilidad³.

1.1.2. Mecanismo de daño tipo I

De acuerdo con la clasificación de Gell y Coombs¹⁶, las alergias que son un mecanismo mediado por células T auxiliares de tipo 2 (Th2) e inmunoglobulina E (IgE), serían clasificadas como respuesta de hipersensibilidad inmediata. Generalmente este mecanismo es el que se observa en enfermedades alérgicas como rinitis o asma, en donde los alérgenos serían los antígenos responsables de inducir la síntesis de IgE³.

Activación de linfocitos Th2

Los alérgenos que ingresan a nuestro organismo son captados por células dendríticas (ubicadas en los epitelios nasal y bronquial, en el tejido linfoide de mucosas digestivas, etc.). Estas células procesan los antígenos en su interior y migran hacia los linfonodos regionales en donde presentan los péptidos derivados del alérgeno, en una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, a un linfocito T naïve. La presencia de interleuquina 4 (IL4), y la ausencia de estímulos inflamatorios de la inmunidad innata (como ocurre en los procesos infecciosos), permiten la activación de los factores de transcripción como el transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6) y la proteína nuclear que reconoce las secuencias de nucleótidos G-A-T-A (GATA-3). Este último es el principal regulador de la diferenciación de este linfocito hacia un fenotipo Th2, y potencia la expresión de los genes de las interleuquinas 4, 5 y 13 (IL4, IL5 e IL13).

Estas citoquinas son las responsables de que las células plasmáticas (linfocitos B) que reconocen el mismo alérgeno, hagan un cambio en el isotipo de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas que secretan y comiencen a producir IgE. Además, la IL5 juega un rol importante en la activación y quimiotaxis de eosinófilos, y la IL13 es capaz de estimular la hipersecreción mucosa bronquial³.

IgE/ Receptores

De la familia de las inmunoglobulinas, la IgE es sintetizada como respuesta inmunológica para los alérgenos. Un individuo puede producir IgE específica para uno o varios alérgenos simultáneamente. Esta IgE sale al torrente sanguíneo y rápidamente se une a receptores específicos de alta afinidad, los FcεR1, que están ubicados en la superficie de mastocitos tisulares y basófilos. Una vez unida a su receptor, la IgE está preparada para cumplir con su función de receptor específico para el alérgeno, de este modo las células quedan sensibilizadas y preparadas para reaccionar frente a un próximo encuentro con el antígeno. Cuando esto ocurre, el entrecruzamiento de receptores FcεR1 que se unen a un alérgeno polivalente, permite que sus porciones intracelulares, acopladas a tirosin kinasas, activen una cascada de señales intracelulares que culminan en la desgranulación de las células efectoras¹⁷. Este proceso de alergia mediada por IgE se muestra en la Figura 1.1.

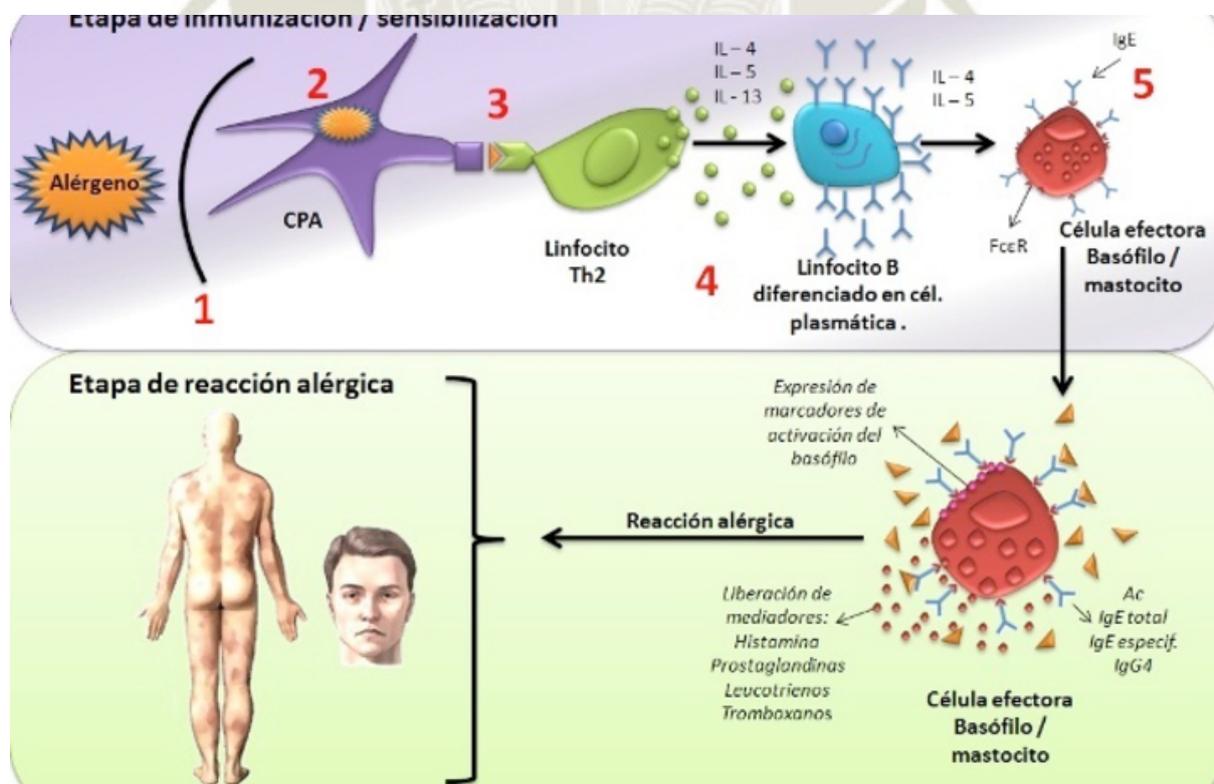


Figura 1.1: Hipersensibilidad Tipo I¹⁸.

1.1.3. Inmunoglobulina E

Las inmunoglobulinas se componen de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Cada cadena está compuesta por un dominio variable (V) NH₂ – terminal y uno o más dominios constantes (C) COOH - terminal, cada una de las cuales consta de dos láminas plisadas β intercaladas, unidas por un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína conservados (Figura 1.3)¹⁹. Cada dominio V o C consta de aproximadamente entre 100 a 130 aminoácidos, con un promedio de 12 a 13 kDa. Una cadena L tendrá una masa aproximada de 25 kDa, una cadena H con sus tres dominios C y su bisagra de aproximadamente 55 kDa. Ambas cadenas L contienen un solo dominio C , mientras que las cadenas H contienen 3 o 4 de estos dominios. Generalmente en las inmunoglobulinas las cadenas H con 3 dominios C tienden a incluir una región bisagra espaciadora entre los dominios $CH1$ que es el primero y el segundo $CH2$. El caso de la inmunoglobulina E (IgE) es único porque carece de esta región de bisagra y es reemplazada por un dominio C-épsilon2, mostrado en la Figura 1.2. Esta falta de bisagra permite que la IgE adopte una conformación más flexible mientras interactúa con los receptores²⁰.

Al igual que las otras inmunoglobulinas, la IgE es un monómero compuesto por dos cadenas L y dos cadenas H capaces de unirse a un total de dos antígenos, esto ocurre a través de las regiones V de las cadenas L y H , donde se crean sitios de unión únicos específicos de antígenos. Las regiones C-terminales de las cadenas pesadas están compuestas por cuatro dímeros $C\epsilon$ (1-4)²¹. La estructura química de estos dímeros es esencial para que las IgE se unan a receptores celulares específicos como el $Fc\epsilon R1$ y CD23. La IgE es la inmunoglobulina más glicosilada, ya que contiene 7 glicosilaciones unidas a asparaginas contenidas en las cadenas pesadas, las cuales son necesarias para unirse a la proteína receptor $Fc\epsilon R1$ ²¹.

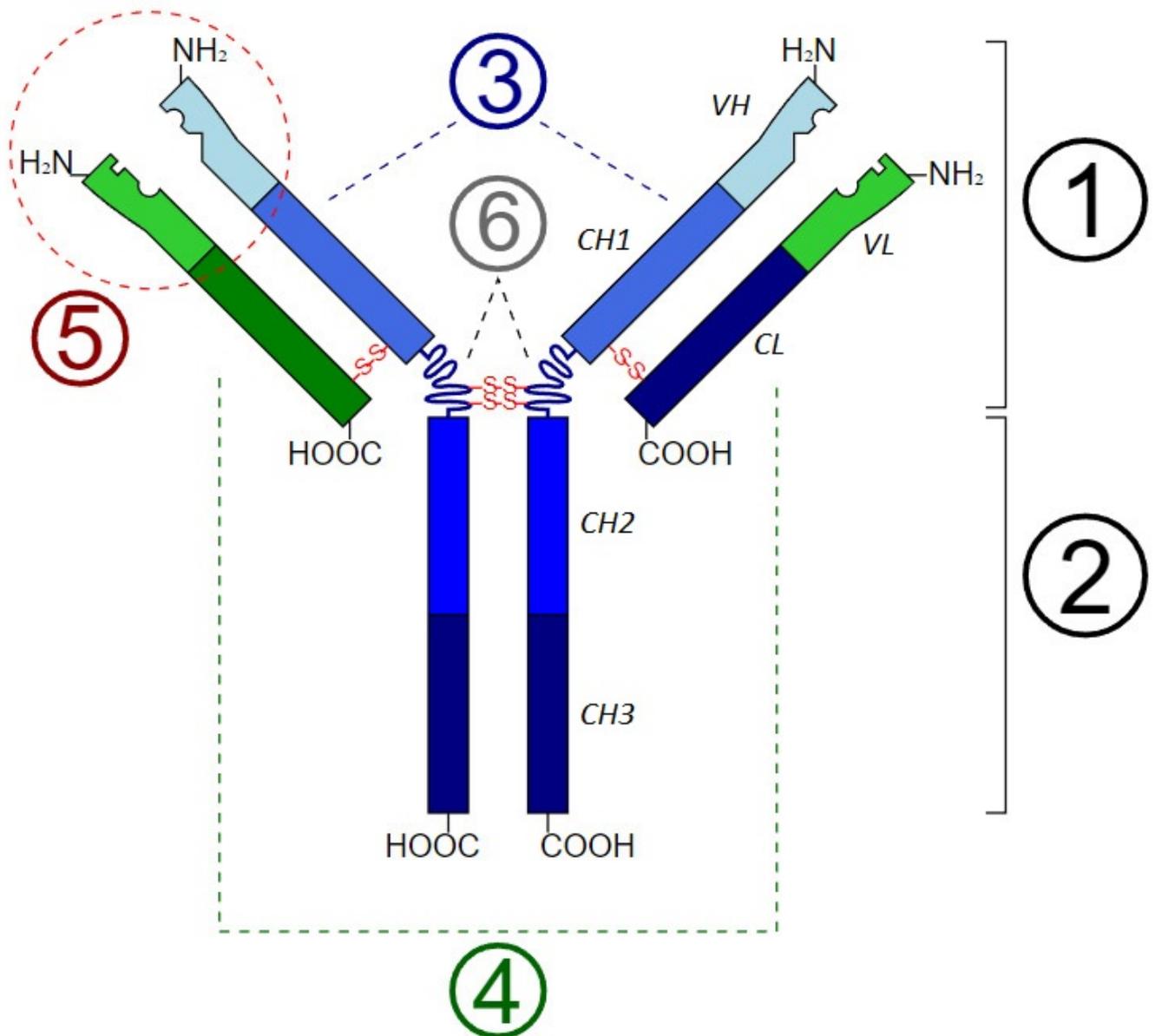


Figura 1.2: Diagrama esquemático de la unidad básica de inmunoglobulina (anticuerpo) (1) Fragmento de unión a antígeno (*Fab*). (2) Fragmento cristalizante (*Fc*). (3) Cadena pesada (consta de regiones *VH*, bisagra, *CH1*, *CH2* y *CH3*: del N-terminal). (4) Cadena ligera consta de regiones *VL* y *CL*: del N-terminal|. (5) Sitio de unión al antígeno. (6) Regiones bisagra²².

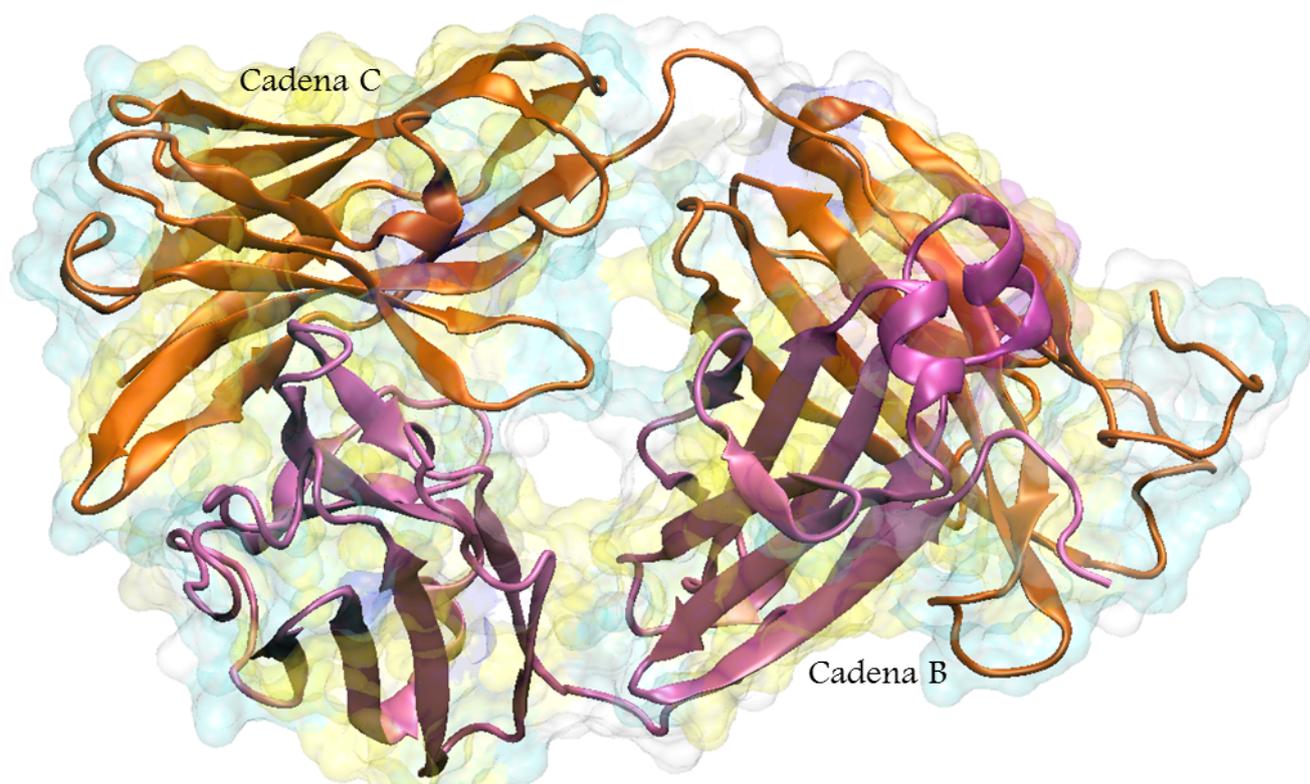


Figura 1.3: Estructura tridimensional de la región Fab de una inmunoglobulina E, en anaranjado se observa la cadena *H* y en morado la cadena *L*.

1.1.4. Alérgeno

Para comprender la fenomenología de las alergias es necesario estudiar las propiedades y estructuras moleculares de los alérgenos. Su estudio puede permitir, mediante modificaciones o sustituciones en las secuencias aminoacídicas (mutagénesis), desarrollar alérgenos alternativos inocuos o de menor actividad alérgica que pueda ayudar a los pacientes que sufren de este tipo de hipersensibilidad. Este procedimiento es ampliamente usado como tratamiento en este tipo de enfermedades.

En las interacciones alérgeno-IgE, se puede describir la estructura proteica del alérgeno en diferentes niveles: estructura primaria, pliegue de proteína, estructura de dominio y estructura de superficie. En este caso, la estructura de la superficie es la más relevante para la unión con el anticuerpo, principalmente el epítipo, que es el sitio unión al anticuerpo. Los epítopos se encuentran sobre la superficie e interactúan a nivel atómico con el anticuerpo (Figura 1.4).

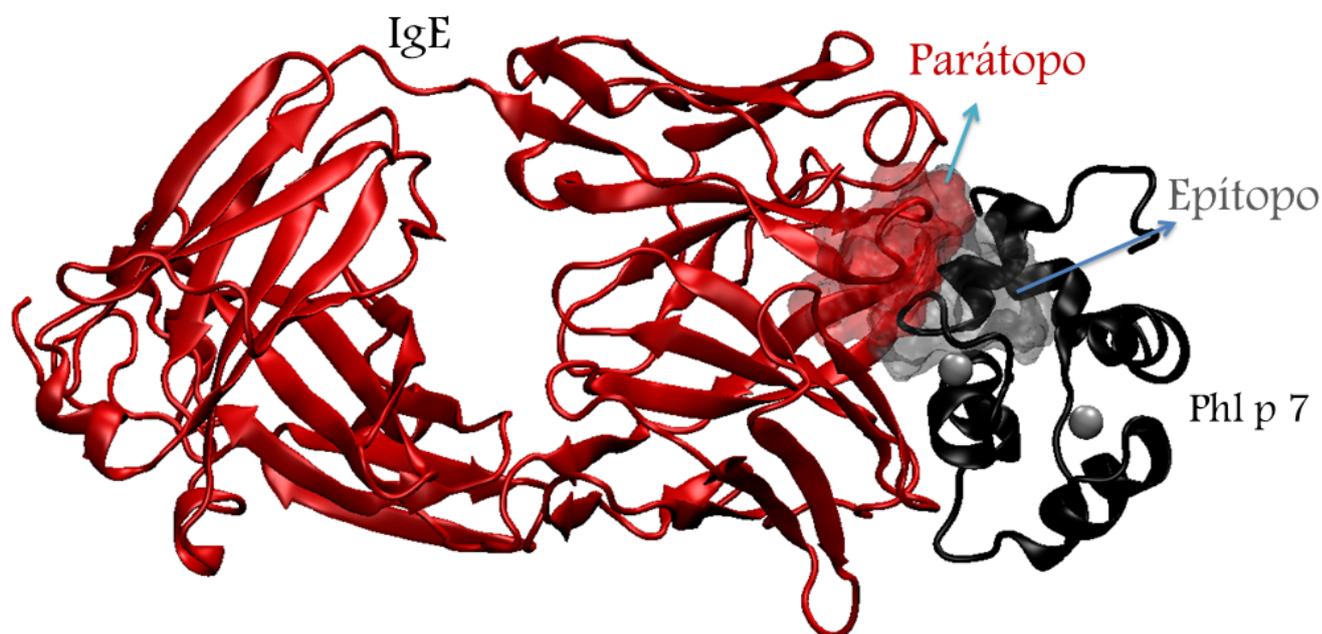


Figura 1.4: Estructura cuaternaria de la IgE-*Phl p 7*, el parátipo de la IgE está resaltado con el método de dibujo de superficie igualmente el epítipo de la *Phl p 7*.

El término alérgeno se utiliza para describir dos o tres propiedades moleculares distintas. Primero, la propiedad de sensibilizar, es decir, inducir al sistema inmunológico a producir anticuerpos de alta afinidad, particularmente de la clase IgE. Como segunda propiedad, está la de provocar una reacción alérgica, es decir, desencadena síntomas alérgicos en un sujeto sensibilizado. Por último, también se utiliza para indicar la propiedad de unirse a anticuerpos IgE. A los alérgenos que tienen todas estas propiedades se les denominan alérgenos completos²³.

1.1.5. Alergenicidad

El concepto de alergenicidad tiene dos definiciones distintas. Para un alergólogo clínico, la alergenicidad refleja la capacidad de un antígeno para inducir síntomas o una reacción cutánea. Por otro lado para un inmunólogo, refleja un tipo en específico de inmunogenicidad (capacidad de una proteína para inducir anticuerpos IgE), o simplemente su capacidad para unirse a anticuerpos IgE.

Existen características determinantes de la alergenicidad. Estructuralmente es posible que sean relevantes la solubilidad, la estabilidad, el tamaño y la capacidad de plegamiento de la proteína. Al momento de entrar un alérgeno al cuerpo a través de la barrera de la mucosa y estar susceptible a las proteasas, es evidente la importancia de estas características en la alergenicidad de la proteína. Un ejemplo de lo determinante que pueden ser

estas características es el tamaño y la solubilidad de los alérgenos que se encuentran en el aire, ya que estos factores son mucho más relevantes para éstos que para los alérgenos alimentarios²³.

Otro factor importante digno de mencionar es la ruta y la dosis de exposición del alérgeno, así como la predisposición genética del individuo. En condiciones naturales, la exposición repetida a dosis bajas de alérgenos (1-10 $\mu\text{g}/\text{año}$) es suficiente para producir sensibilización en individuos genéticamente predispuestos²⁴. La capacidad alérgica que posee el polen se debe a que éstos se depositan en las mucosas. Los estudios aerodinámicos realizados, sugieren que las partículas de dimensiones por encima de los 10 μm quedan retenidas en las vías respiratorias superiores. Solo el 1-2 % de los granos inhalados pueden alcanzar los bronquios, y la penetración en la vía bronquial aumenta si la respiración se realiza por la boca y de un modo particular durante el ejercicio físico²⁵.

1.2. Polinosis

1.2.1. Definición

Actualmente se define por polinosis a la inflamación de la mucosa nasal y/o conjuntival y/o bronquial, causada por alérgenos presentes en los granos de polen a través de un mecanismo inmunológico mediado por IgE²⁵. En 1819, el Dr. Bostock describió su propia enfermedad que, a diferencia de la coriza común, solamente se producía durante la estación del heno en Inglaterra (junio – julio). Años después, el Dr. Blackley fue el primer autor que describió a la polinosis (también llamada fiebre del heno), y que ésta era desencadenada por la exposición ambiental a granos de polen de gramíneas²⁶.

La polinosis se ha asociado históricamente a manifestaciones clínicas nasales y conjuntivales, pero en porcentajes variables y dependiendo de las características que posea cada tipo de polen. Ésta produce procesos respiratorios como la rinitis alérgica (RA) y el asma, con diferentes grados de gravedad. La RA es una reacción de hipersensibilidad de tipo I, que se caracteriza por la presencia de rinorrea, estornudos, obstrucción nasal y prurito conjuntival. Se producen por la interacción de una IgE presente en la membrana del mastocito de la mucosa nasal y el alérgeno correspondiente. La RA es una de las causas más frecuentes de sinusitis crónica, además el 50-90 % de los pacientes con Otitis Media Aguda (OMA) también sufren de RA²⁷. Además, asma y RA frecuentemente van juntos, se demostró que el 75 % de los pacientes con asma también sufrían de RA estacional²⁸. La RA desencadenada por la polinosis es una enfermedad relevante ya que causa problemas de salud tan graves que inhabilitan a los individuos que la padecen, por lo tanto, se debe

considerar un buen diagnóstico y tratamiento para así evitar las numerosas complicaciones que trae consigo²⁹.

1.2.2. Rinitis alérgica y asma en el Perú

En muchos estudios se describe muy frecuente la coexistencia de RA y asma, ya que la literatura señala que la prevalencia de RA en pacientes con asma va desde un 78 % hasta 95 %³⁰⁻³². Pero en el estudio de Perez Lu et al. se reporta que en los servicios pediátricos del HNCH en Lima, el 10.7 % de niños que fueron evaluados tuvieron diagnóstico previo de RA, constituyendo un valor muy bajo a la cifra esperada. Esto revela que hay una falta de conocimiento e información de los padres sobre este tipo de alergia y su importante relación con el asma²⁹.

En la población pediátrica peruana con diagnósticos de asma y/o RA. Se evidenció que el 82,7 % de los pacientes estuvo sensibilizado a algún aeroalérgeno (76,2 % a más de uno) y se asoció con la edad, grupos etarios y niveles de IgE total. Los ácaros fueron los agentes sensibilizantes más frecuentes siendo el *Dermatophagoides farinae* el más común (65,2 %) ³³.

En el Hospital III Yanahura-EsSalud en Arequipa se observó que de un total de 812 pacientes pediátricos asmáticos un 84.77 % presentaba con frecuencia RA con una prevalencia de 45.93 %³⁴. EsSalud reporta que 1 de cada 3 peruanos va desarrollando una enfermedad alérgica y se estima que para el 2050 casi el 50 % de peruanos desarrollará algún tipo de alergia³⁵.

1.2.3. Polen

Definición

Los granos de polen son las células sexuales masculinas de las plantas que poseen flores. Se forman en el interior de los estambres y, un vez maduros, son liberados. Su función biológica es alcanzar la parte femenina de una flor de su misma especie y de esta forma poder hacer posible la fecundación de la ovocélula. El polen se traslada desde el órgano donde se ha formado hasta la parte femenina de la flor, este proceso se conoce con el nombre de polinización. Generalmente, los casos más frecuentes de polinización son por anemofilia, es decir cuando el viento es el medio de arrastre y la entomofilia que es la diseminación de los granos de polen por los insectos (abejas, mariposas, escarabajos, etc.).

El proceso de polinización requiere que los granos de polen sean células especialmen-

te resistentes, ya que éstas están sometidas a condiciones ambientales adversas. Sin esta resistencia, se podría provocar el colapso y desecación de los componentes celulares, alterándolos y volviéndolos un polen inviable. Como una adaptación a estas condiciones adversas, los granos de polen están recubiertos por una pared de notable resistencia llamada exina. Esta pared está constituida por uno de los materiales más inalterables de la naturaleza, la esporopolenina, la cual es muy resistente a ácidos y bases, además de que las variaciones térmicas de la naturaleza no la afectan. Otras características que puede presentar la estructura de la exina son las aperturas en su superficie en donde podemos observar los poros²⁵.

Los granos de polen maduros están recubiertos de gotas de pollenkitt el cual está formado por ceras, lípidos, pequeñas moléculas aromáticas y proteínas, este es muy denso y abundante en un grano de polen de tipo entomófilo, pero no es así en un grano de polen anemófilo³⁶.

La pared polínica tiene que cumplir diferentes funciones, por eso es que la diversidad y complejidad de ésta es directamente proporcional con las funciones que tiene que llevar a cabo como: brindar protección física al contenido citoplasmático, determinar las rutas de transferencia del agua y participar en el transporte de proteínas, la interacción de enzimas involucradas entre el polen y la superficie del estigma, entre otros. Encontramos por debajo de la exina y cubriendo el citoplasma a la intina. Esta capa es de naturaleza polisacárida, formada por pectinas, celulosas y diversos azúcares, así como proteínas y enzimas características. La intina tiene un papel fundamental en la protección del citoplasma, regulando los cambios de presión osmótica. Finalmente, tenemos al citoplasma del grano de polen que contiene los orgánulos subcelulares, incluyendo un núcleo vegetativo y otro germinativo, así como los gránulos de almidón y partículas *p* (polisacáridos)³⁶ como se muestra en la Figura 1.5.

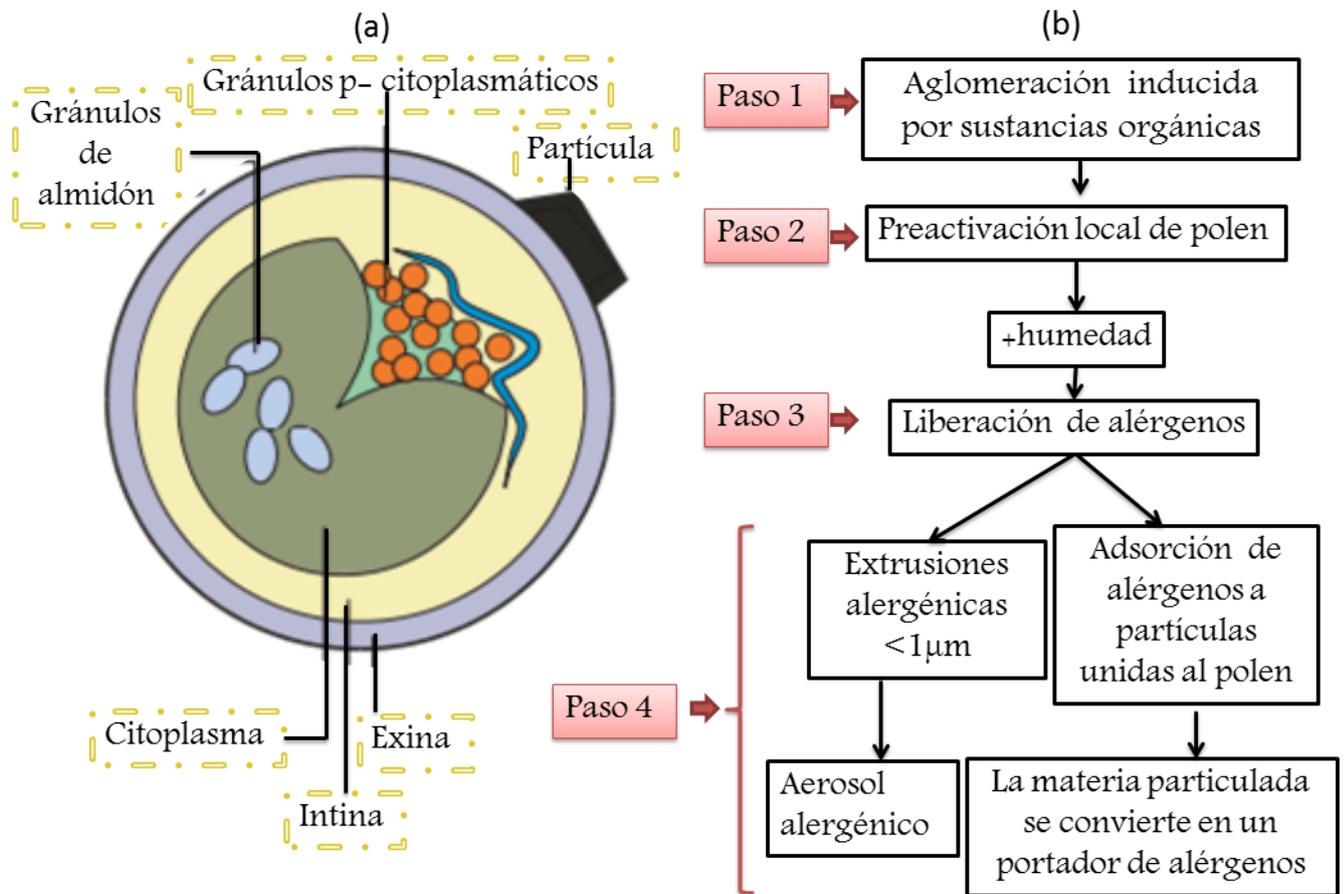


Figura 1.5: Polen. (a) A la izquierda se presenta un esquema de un grano de polen con una partícula adherida a él. (b) Diagrama de flujo en el que se muestran los diversos pasos en la generación de aerosoles alérgicos.

Polen como transportador de alérgenos

El grano de polen es el vehículo de aeroalérgenos de exterior más importante. Durante el proceso de dehiscencia de las anteras, los granos de polen sufren una deshidratación rápida que reduce su volumen en un 35% y cuando llegan a un estigma receptor o a un medio húmedo, como puede ser las mucosas de las personas expuestas, experimentan una hidratación considerable. Con la hidratación se produce una serie de cambios, tanto metabólicos como estructurales, que culminan en la liberación de un exudado que contiene lípidos, enzimas y proteínas (como la *Phl p 7*), que participan en la formación del tubo polínico en las plantas. Estas proteínas presentes en los granos de polen que intervienen en el proceso germinativo, son también responsables de la respuesta alérgica en las personas atópicas³⁶.

Los alérgenos están localizados dentro del grano de polen en patrones de distribución específicos. En un estudio se encontró que en el polen seco y no humedecido, los alérgenos

investigados mostraban poca actividad dentro de la matriz citoplasmática, pero una fuerte actividad dentro de orgánulos como mitocondrias, partículas *p* y gránulos de almidón³⁷. Un ejemplo de esto se encuentra en el estudio de los alérgenos del polen de gramíneas el cual revela que la *Phl p 5* está presente en la matriz citoplasmática y en la exina, pero no en los gránulos de almidón. La *Phl p 1* se localiza en el citoplasma y en la intina, pero no en la exina. La *Phl p 4* está en la matriz y los gránulos de almidón y finalmente, la *Phl p 6* se encuentran en los sitios de la matriz y en los gránulos de almidón, y dentro de las partículas *p* del citoplasma, respectivamente.

Existen variables bien definidas en las cuales se da la liberación de alérgenos entre las que se encuentran el pH y la temperatura. Ejemplos de estos son los valores máximos reportados para la liberación de las proteínas del polen del abedul, pasto y pino (37 ° C y pH 9.0), mientras que para la liberación de los principales alérgenos *Bet v 1* y *Phl p 5* se han reportado un pH de 7.4³⁸.

Propiedades de los alérgenos polínicos

Los alérgenos polínicos comparten ciertas características que les permiten persistir en el ambiente, superar las barreras epiteliales del cuero y desencadenar reacciones alérgicas. En general, estas proteínas tienen un peso de 5 a 70 kDa, son solubles, estables y abundantes en el ambiente³⁹. Al parecer las propiedades alérgicas de las proteínas polínicas están vinculadas con la cantidad y velocidad de solubilidad de las partículas aerotransportadores⁴⁰.

Un prerequisite importante para que una proteína de un grano de polen sea alérgica, es que su difusión tras el contacto con la mucosa sea rápida. Estas proteínas no solo pueden provocar una respuesta de IgE, sino que también desencadenan la liberación de mediadores de los mastocitos o células basófilas mediante la unión de dos moléculas de IgE citotrópicas a través de los receptores FcεR1³⁷.

Reactividad cruzada

La reactividad cruzada (Rc), es un fenómeno inmunomediado por IgE que reconoce, se une y finalmente induce una respuesta inmunitaria a moléculas alérgicas similares (homólogas). La Rc a menudo ocurre entre moléculas alérgicas de especies estrechamente relacionadas o entre moléculas con funciones similares que están presentes en especies muy diferentes pero que pertenecen a la misma familia de proteínas⁴¹.

En general, el término reactividad cruzada debe usarse para describir características clínicas bien definidas que revelen la reactividad a una fuente sin exposición previa^{42,43}.

El término de co-reconocimiento, que incluye por definición a la Rc, podría ser adoptado de manera útil para definir a gran parte de las alergias mediadas con IgE. Este co-reconocimiento es importante cuando se da la co-exposición a varias fuentes que portan moléculas homólogas no permite la identificación del sensibilizador⁴¹.

El fundamento molecular de la Rc en la alergia es la presencia de alérgenos homólogos que poseen distintos grados de identidad entre sus secuencias aminoácidas. Aunado a esto, debe de contar con estructuras tridimensionales similares que determinen la presencia de epítomos comunes reconocidos por un mismo tipo de anticuerpo IgE. Para que ocurra una Rc se requiere, en general, que las proteínas tengan más de un 70 % de homología en sus secuencias ya que se sabe que cuando la identidad es inferior al 50 %, la Rc es poco frecuente^{40,44}. Sin embargo la reacción alérgica clínicamente puede ser variable aún teniendo una alta homología y, a menudo, dependerá de las fuentes de alérgenos específicos involucrados⁴¹.

A las proteínas que presentan alta Rc se les denomina panalergenos. Éstas son reconocidas como ubicuas y pueden provenir de diferentes fuentes relacionadas y no relacionadas. La Rc de IgE generalmente se aborda desde una perspectiva de alérgenos, lo que significa que la Rc es una consecuencia de la similitud estructural entre proteínas homólogas que se traduce en regiones de secuencias conservadas, plegamiento tridimensional y función⁴⁵. Los panalergenos conocidos, comprenden actualmente solo unas pocas familias de proteínas, las cuales incluyen a las profilinas, las polcalcinas y las proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTP)⁴⁶.

1.3. Proteínas de unión al calcio como alérgenos

Hace más de 30 años, la parvalbúmina, un importante alérgeno de los peces, fue la primer proteína descrita y caracterizada como alérgeno de unión al calcio^{47,48}. Desde entonces, se han reportado un gran número de alérgenos alimentarios y polínicos, y el análisis de sus secuencias de ADNc (el cual codifica alérgenos), reveló la presencia de los típicos motivos de la EF-hand que se unen al calcio dentro de muchos de los alérgenos. Por tanto, los alérgenos que se unen al calcio también pueden agruparse de acuerdo con la Rc inmunológica y no solo por el número de dominios de EF-hand. Las dos principales familias de alérgenos dentro de las proteínas de unión al calcio incluyen a las polcalcinas (presentes en árboles, pastos y malezas), y a las parvalbúminas de varias especies de peces (carpa, bacalao, caballa y salmón)⁴.

1.3.1. Polcalcinas

Las polcalcinas son un grupo de alérgenos que pertenecen a la familia de proteínas de unión al calcio (CBP). Éstas comparten dominios comunes denominados *EF-hand* (motivos de hélice-bucle-hélice), en donde están situados los iones calcio mediante interacciones electrostáticas con los aminoácidos del bucle (Figura 1.6). Según el número de dominios *EF-hand* que se unen al calcio, se han descrito al menos tres tipos de polcalcinas en el polen, los que presentan 2 *EF-hand* (*Aln g 4*, *Amb a 9*, *Art v 5*, *Bet v 4*, *Che a 3*, *Cyn d 7*, *Fra e 3*, *Ole e 3*, *Phl p 7* y *Syr v 3*), 3 *EF-hand* (*Amb a 10* y *Bet v 3*) y finalmente las que presentan 4 *EF-hand* (*Jun o 4* y *Ole e 8*)⁴⁵.

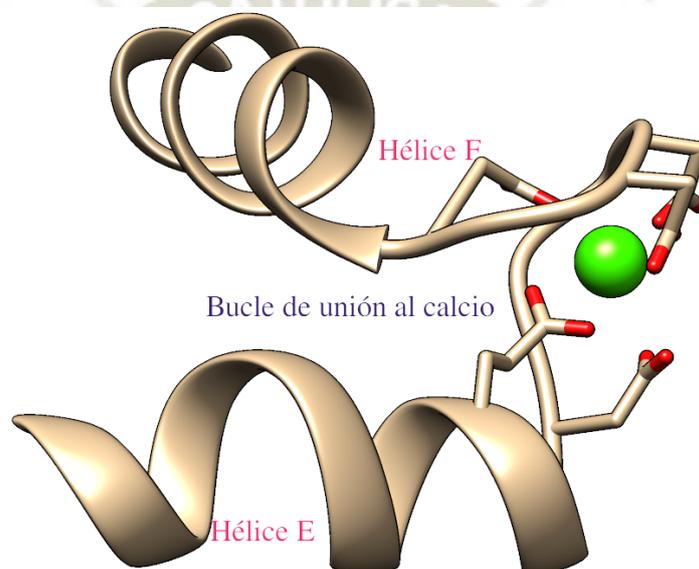


Figura 1.6: *EF-hand*. El calcio está unido por una estructura de hélice-bucle-hélice que está formada por las hélices E y F (letras asignadas a las hélices en el orden en que están posicionadas, comenzando en el dominio N-terminal)

La función biológica de las polcalcinas aún no es clara. Sin embargo, debido a su localización específica en el polen y a su capacidad para unirse al calcio, se ha propuesto que las polcalcinas funcionan en el control de los niveles de calcio intracelular durante la germinación del polen⁴. Curiosamente, la propiedad de unión al calcio de las polcalcinas afecta tanto a la unión con la IgE como a la termoestabilidad de la molécula. La asociación con el calcio induce cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la proteína, pudiéndose distinguir dos estados conformacionales de las CBP, la forma cerrada llamada “*apo*”, que es una estructura libre de calcio y las formas abiertas “*holo*”, estructuras asociadas con calcio⁴⁹.

Por otro lado, un estudio comparativo entre alérgenos con dos, tres y cuatro dominios de *EF-hand*, reveló que la *Phl p 7* del *Timothy grass* es la polcalcina con mayor reactividad

cruzada. Por tanto, se ha sugerido que *Phl p 7* podría servir como molécula marcadora para la identificación de múltiples sensibilizaciones al polen¹⁰.

1.4. *Phl p 7*

La estructura primaria de una polcalcina suele ser muy conservada, sin embargo ésta puede variar en la región N-terminal y en su longitud aminoacídica. Generalmente las polcalcinas monoméricas, como es el caso de la *Phl p 7*, presentan un peso molecular de 8 a 9 kDa y muestran el motivo estructural típico de polcalcina. El número de aminoácidos en este tipo de proteínas oscilan entre los 77 a los 84 aminoácidos y poseen dos dominios *EF-hand*.

Las propiedades de unión a calcio de la *Phl p 7* no se consideran notables, ya que al comparar su energía libre para la unión proteína-calcio (-17.8 ± 0.1 kcal/mol), ésta es más favorable si la comparamos con la *Bra n 2* (-17.3 ± 0.1 kcal/mol), pero desfavorable en comparación con las *Bet v 4* (-17.9 ± 0.1 kcal/mol) y *Bra n 1* ($-218,2 \pm 0.1$ kcal/mol)⁵⁰. La unión del primer calcio provoca un cambio conformacional importante en la estructura de la polcalcina que facilita la unión del segundo calcio y genera una área de superficie apolar sustancial⁵¹.

Anteriormente se reportó que la *Phl p 7* unida a calcio generaba una disposición dimérica intercambiada por dominios⁶. Sin embargo, existe un estudio en el que analizaron la velocidad de sedimentación y equilibrio de esta proteína a pH neutro, los datos indicaron que a este pH la estructura se componía exclusivamente de monómeros⁵¹. En este análisis concluyeron que la proteína era monomérica al menos en solución salina neutra, disipando la duda persistente sobre la estructura terciaria de la *Phl p 7* en pH fisiológico.

La caracterización entre la *Bet v 4*, la *Bra n 1*, la *Bra n 2* y la *Phl p 7* incluyó una comparación de sus estabildades estructurales observándose que la *Phl p 7* exhibía estabilidad atípica a los cambios de temperatura⁵⁰. Mientras que las temperaturas de fusión de las formas apo de la *Bet v 4*, la *Bra n 1* y la *Bra n 2* se agrupan cerca de los 55 °C, la de *Phl p 7* fue de 78 °C. Aunque presenten similitud de secuencia global, la *Phl p 7* fue sustancialmente más estable. La mayor estabilidad se correlacionó con un ΔC_p anormalmente bajo para el desplegamiento, lo que indica que la *Phl p 7* puede adoptar un estado desnaturizado relativamente compacto.

La secuencia de la *Phl p 7* presenta más residuos apolares que en las otras isoformas⁵². Hay una correlación directa entre el contenido hidrofóbico y la estructura residual en el estado desnaturizado, que la *Phl p 7* presente más residuos apolares ofrecería una explicación potencial de su elevada estabilidad⁵¹.

1.4.1. Importancia de la *Phl p 7*

La relevancia que tiene la *Phl p 7* para su estudio, radica en el papel que cumple en la germinación y el efecto que tiene en las personas como desencadenante de la hipersensibilidad tipo I. De manera general podemos hablar de dos características importantes:

- Primero, porque está bien establecido que la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico son procesos dependientes de calcio. Con respecto al crecimiento del tubo polínico, se ha puesto de manifiesto que el gradiente de calcio citoplasmático está fuertemente correlacionado con el crecimiento del tubo⁵³ y que hay un gradiente de calcio dirigido hacia la punta⁵⁴. Se ha demostrado mediante imágenes que los pulsos de calcio coinciden con las tasas de crecimiento máximas de los tubos polínicos^{55,56}. Por lo tanto, la importancia de los niveles de calcio para la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico debe requerir la presencia de proteínas polínicas que controlen y regulen el metabolismo de éste. La *Phl p 7* y otras proteínas de unión a calcio, por ejemplo, la *Bet v 3*, que se expresan abundantemente en pólenes de plantas pero no en otros tejidos, pueden representar tales proteínas reguladoras. A los pocos minutos de la hidratación del polen, la *Phl p 7* se eluye completamente del grano de polen, un proceso que probablemente influirá en el equilibrio entre las concentraciones de calcio intracelular y extracelular y, por lo tanto, afectará la germinación del polen y el crecimiento del tubo.
- En segundo lugar, la expresión específica de polen de los alérgenos relacionados con *Phl p 7* es de interés en cuanto a su papel como alérgeno polínico altamente reactivo. La *Phl p 7* y los alérgenos que presentan los dominios *EF-hand* relacionados, son alérgenos altamente reactivos presentes en polen de árboles, pastos y malezas. Aproximadamente el 10% de los individuos alérgicos al polen reaccionan con los alérgenos de éstos con dominio *EF-hand* y, por lo tanto, sufren síntomas alérgicos después del contacto con pólenes de muchas especies de plantas no relacionadas (Rc). Aunque se reconoce en una prevalencia bastante baja (10% de los pacientes alérgicos al polen), se conoce que la *Phl p 7* recombinante (*rPhl p 7*) exhibió una actividad alérgica extremadamente potente⁵⁷. Esta proteína indujo la liberación de histamina basófila y las reacciones cutáneas de tipo inmediato en concentraciones extremadamente bajas representando un alérgeno biológicamente muy activo. La actividad alérgica de la *rPhl p 7* puede estar relacionada con su correcto plegamiento. De acuerdo con el análisis de dicroísmo circular, esta proteína se plegó y se observó que contenía en su mayoría elementos de estructura secundaria helicoidal. El plegamiento adecuado representa un requisito previo para que un alérgeno

interactúe con la IgE unida a la célula efectora y la reticule en la solución, y así induzca la liberación de mediadores biológicos.

1.5. Maíz en el Perú

El Perú, con una población de 30.1 millones de habitantes, es el tercer país más extenso de Sudamérica y uno de los 17 países con mayor biodiversidad en el mundo al contar con 84 de las 104 zonas de vida del planeta. Su territorio cuenta con una extensión de 128.5 millones de hectáreas distribuidas en tres regiones naturales marcadamente distintas: la Costa (12%), la Sierra (28%) y la Selva (60%). Del conjunto de recursos naturales renovables, el suelo con fines agrícolas es el recurso más escaso, puesto que sólo el 5.9% del territorio nacional tiene capacidad para producir productos agrícolas, y el resto del área se distribuye en tierras de protección (43%), tierras con aptitud forestal (37.9%) y para pastos (13.2%). Asimismo, de acuerdo a estadísticas del IV CENAGRO (2012), el 28% de la superficie agrícola corresponde a tierras con cultivos permanentes, 3% a cultivos asociados, y el resto (69%) a tierras de labranza destinadas a los cultivos transitorios, barbecho, tierras de descanso y no trabajadas⁵⁸. La producción de maíz sigue un ritmo positivo, presentando en las últimas dos décadas una tasa de crecimiento promedio anual de 3%. Así, de producir 793,798 toneladas en 1990, se produjeron 1,883,768 toneladas en el 2011, creciendo en un 137% durante ese período. A noviembre del 2012, la producción alcanzada fue de aproximadamente 1,523,075 toneladas⁵⁹.

1.5.1. Condiciones medio ambientales y espaciales

El cultivo de maíz está condicionado por las características del entorno natural donde se desarrolla el cultivo. En la Costa, la presencia de terrenos planos facilita la mecanización de las labores agrícolas, mientras que la topografía accidentada que predomina en la Sierra, hace más difícil el uso de maquinaria, sobre todo en el caso del maíz que se cultiva principalmente en suelos marginales de laderas. En el caso de la Selva, aunque una parte importante del cultivo se desarrolla en suelos planos inundables, se trata de una región donde la poca rentabilidad de la agricultura no ha hecho posible el desarrollo de un mercado de servicios. En lo que respecta al clima, la agricultura de la Sierra está expuesta a la presencia de sequías, granizadas y heladas. De acuerdo a la Secretaría Técnica del Grupo Consultivo para la Investigación Agraria Internacional (CGIAR), el 85% de la producción de maíz amiláceo en el Perú se cosecha y el resto se pierde por heladas o sequías. Por su parte, la Costa se caracteriza por tener un clima desértico y de

temperatura moderada alrededor de los 18°C, con escasas precipitaciones y es más estable al no estar sujeto a grandes fluctuaciones de temperatura⁵⁹.

1.6. Biología computacional: Simulación molecular de proteínas

1.6.1. Biología computacional

La biología computacional es la rama de las ciencias naturales que utiliza herramientas informáticas para entender mejor los sistemas biológicos de alta complejidad. Uno de sus objetivos es la de estudiar sistemas macromoleculares de naturaleza biológica, como proteínas o moléculas de ADN, para procesar y almacenar información. La biología computacional, ante todo, es una ciencia interdisciplinar, se ocupa de desarrollar algoritmos y modelos matemáticos que puedan ayudar a entender mejor los sistemas biológicos y la relación que existe entre ellos.

La bioinformática es una herramienta muy valiosa que puede ayudarnos a entender mejor la complejidad de todas estas áreas de estudio, pero para poder utilizarla es necesario poseer conocimientos de biología, programación, estadística, física, química, matemáticas, bioquímica, genética o la biología molecular, entre otras disciplinas científicas.

1.6.2. Modelado de proteínas

Introducción

Gran parte de la bioquímica que subyace a la salud, la medicina y numerosas aplicaciones biotecnológicas, está regulada por proteínas, por lo que la capacidad de éstas para efectuar tales procesos está dictada por el ensamblaje estructural tridimensional de dichas proteínas. Por lo tanto, una comprensión detallada de la bioquímica requiere no solo el conocimiento de la secuencia constituyente de las proteínas, sino también una comprensión detallada de cómo esa secuencia se pliega espacialmente. El gran número de proteínas distintas impide una caracterización de laboratorio rigurosa del proteoma estructural completo, pero afortunadamente es posible una predicción eficiente de la estructura *in silico* para muchas proteínas que no se han caracterizado experimentalmente.

Una técnica que continúa proporcionando predicciones precisas y eficientes de la estructura de las proteínas, llamada modelado comparativo (homología), se ha convertido en una herramienta fundamental en muchas disciplinas biológicas. En esta sección se enfocará

en los aspectos básicos de la selección de plantillas, alineación de secuencias, conformación espacial, modelado de bucles y huecos, modelado de cadenas laterales, refinamiento y validación estructural, además de proporcionar una nueva e importante discusión sobre herramientas computacionales automatizadas para la predicción de estructuras de proteínas⁶⁰.

Método

En la práctica, debe considerarse al modelado comparativo como una estrategia y no como una técnica, ya que reúne información de varios métodos que engloban varias técnicas, incluidas las de ensamblaje y asociativas, para hacer una predicción de estructura tridimensional unificada. En general, estos algoritmos de predicción se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Identificar proteínas molde (plantillas) con similitud estructural con la diana a partir de la homología basada en la secuencia o de la similitud fisicoquímica.
2. Alinear la secuencia diana con todas las secuencias de plantilla relevantes, de acuerdo con los mismos argumentos de homología o similitud fisicoquímica empleados en el paso 1.
3. Alinear espacialmente todas las estructuras de la plantilla en un solo marco y usar la alineación de secuencia para proyectar la estructura de la proteína diana en este marco.
4. Estimar las estructuras para los fragmentos de proteínas diana que están mal representados por la variedad molde, o bien omitirlos de la estructura predicha.
5. Alinear las cadenas laterales objetivo con cadenas laterales análogas de las estructuras de la plantilla, o seleccionar entre varios modelos su disposición de acuerdo con las preferencias espaciales y torsionales conocidas.
6. Refinar las posiciones atómicas para impedir los contactos físicos y las tensiones mediante búsquedas conformacionales (evitar los choques estéricos).
7. Evaluar el modelo relajado final para determinar que su energía estructural sea mínima. Cada paso anterior implica varias consideraciones metodológicas y estratégicas, algunas de las cuales brindan oportunidades para la retroalimentación interactiva de los pasos anteriores⁶⁰, como se muestra gráficamente en el diagrama de flujo (Figura 1.7).

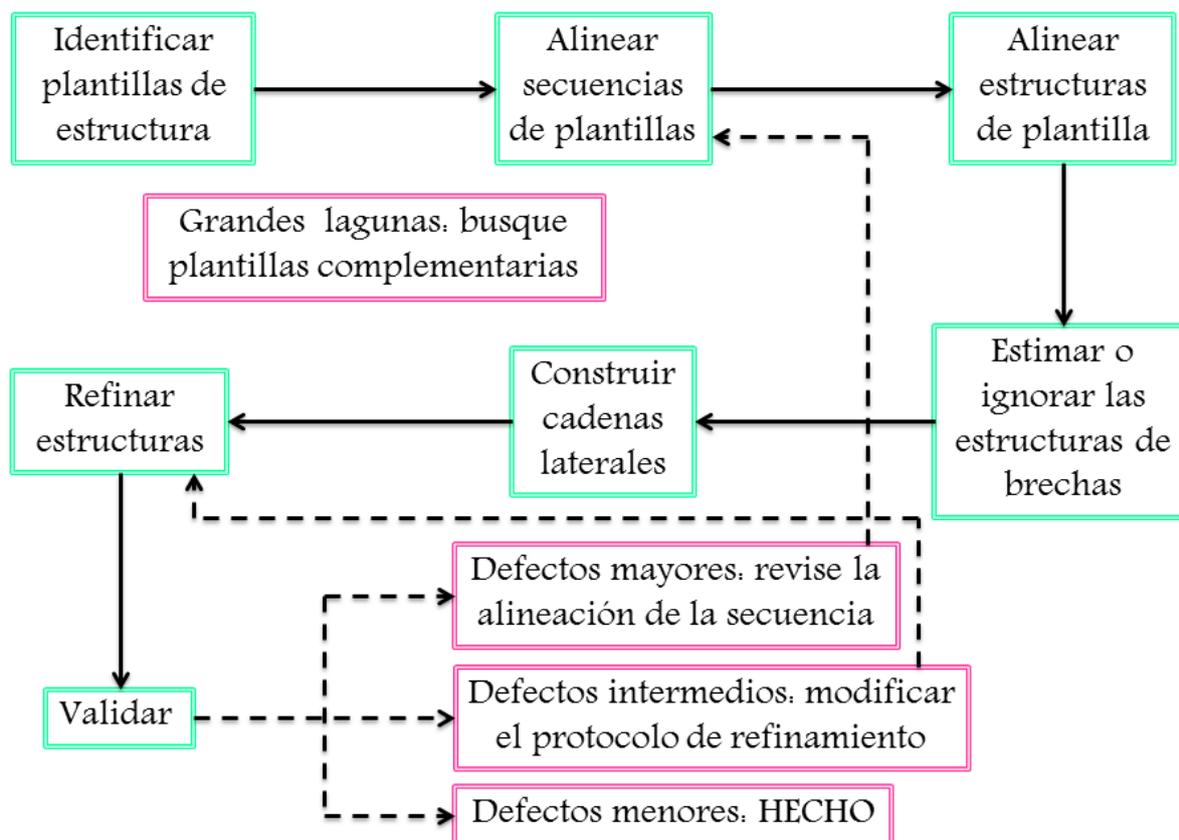


Figura 1.7: Diagrama de flujo del modelado comparativo de proteínas que muestra un proceso estándar (flechas sólidas) y los mecanismos de retroalimentación / refinamiento (flechas discontinuas).

1.6.3. Herramientas bioinformáticas

Protein Data Bank

La base de datos “Protein Data Bank” (PDB),⁶¹ es uno de los primeros y el banco más completo de metadatos que existen acerca de estructuras macromoleculares. En su página es posible descargar los archivos de las coordenadas atómicas e información relevante adicional que describe a las proteínas cuyas estructuras tridimensionales se han determinado por cristalografía de rayos X, espectroscopía NMR o crio-microscopía electrónica de transmisión en el espacio. Existen varios formatos de descarga, entre los que se encuentran los archivos tipo pdb, los cuales presentan una resumida descripción de la proteína y los detalles experimentales de como fue obtenida su estructura, la resolución empleada, seguido por la secuencia de aminoácidos y una lista de los átomos que la componen. Este archivo puede contener también información adicional sobre las características físicas de los átomos (factores-b, probabilidad espacial ocupacional, carga, etc.)⁶².

Visualización de estructuras tridimensionales

Las estructuras tridimensionales de biomoléculas pueden ser visualizadas con diferentes programas informáticos disponibles, tanto libres como de licencia comercial. Entre ellos podemos destacar PyMOL,⁶³ Visual Molecular Dynamics (VMD),⁶⁴ UCSF Chimera,⁶⁵ DeepView (Swiss-Pdb Viewer),⁶⁶ Jmol,⁶⁷ RasMol,⁶⁸ Protein Explorer entre otros. Lo que nos permiten estos programas es visualizar una estructura molecular si conocemos sus coordenadas atómicas (generalmente en un archivo de formato texto). Estos visualizadores por ordenador pueden funcionar independientemente de las páginas web o funcionar como plugins en estas páginas⁶².

1.6.4. Dinámica molecular

Introducción

En este trabajo de tesis los resultados de las simulaciones computacionales están basadas en la teoría de la dinámica molecular (MD). Ésta es una poderosa herramienta para estudiar sistemas complejos de la materia, la cual permite calcular las diferentes trayectorias (posiciones en función del tiempo) de los átomos o partículas que forman la materia y que nos permite visualizar y analizar el comportamiento microscópico de los sistemas que se estén estudiando. A partir de esta información se pueden obtener los valores de las diferentes propiedades macroscópicas (tanto estáticas como dinámicas).

Mediante un buen modelo computacional es posible reproducir experimentos de laboratorio. Además, permite probar modelos teóricos existentes en rangos de presión y temperaturas imposibles de alcanzar experimentalmente. De esta manera, las observaciones experimentales pueden tener una explicación teórica e incluso molecular de los sistemas. Un papel fundamental también lo juega la visualización de los resultados obtenidos con los diferentes programas que existen.

Mecánica molecular

La Mecánica Molecular clásica (MM), ignora los movimientos electrónicos y calcula la energía de una molécula o conjunto de moléculas únicamente en función de la disposición de los átomos, por lo que es el nivel de teoría generalmente escogido para estudiar macromoléculas biológicas como el DNA o las proteínas⁶⁹.

Los cálculos de MM se basan en la aproximación de Born-Oppenheimer que permite separar los movimientos del núcleo y de los electrones. Se considera que, debido a que la masa del núcleo es muy superior a la de los electrones, éstos pueden adaptarse rápidamente

a cualquier cambio en las posiciones de los núcleos. Por lo tanto, la energía de una molécula en su estado basal, puede considerarse como una función de las coordenadas de los núcleos atómicos. Esta función se la denomina Campo de Fuerzas o Force Field. Los cambios que se producen en la energía potencial de un sistema pueden representarse como una superficie, denominada superficie de energía potencial⁷⁰.

Campo de fuerza

Un campo de fuerzas está formado por dos elementos claramente distinguibles, el conjunto de ecuaciones que son las funciones potenciales (utilizadas para generar las energías, sus derivadas y las fuerzas) y los parámetros empíricos usados por cada uno de los términos. Una característica importante de un campo de fuerzas es su capacidad de poder ser transferido, es decir, una misma serie de parámetros puede ser empleada para el estudio de distintas moléculas relacionadas entre sí⁷¹. La mayoría de los campos de fuerzas empleados para sistemas moleculares se pueden definir mediante una ecuación con dos componentes principales que describen las interacciones enlazantes y no enlazantes del sistema:

$$E_{total} = \overbrace{E_{enlace} + E_{ángulo} + E_{torsional}}^{Enlazantes} + \overbrace{E_{vdw} + E_{elec}}^{No enlazantes} \quad (1.1)$$

Los términos enlazantes incluyen las contribuciones debidas a los enlaces covalentes, ángulos de valencia y ángulos torsionales propios e impropios. Los términos no enlazantes se definen por un término de atracción - repulsión de tipo Lennard-Jones para las fuerzas de van der Waals y un término coulombico para las interacciones electrostáticas. En la Figura 1.8 se esquematizan ambos tipos de interacciones.

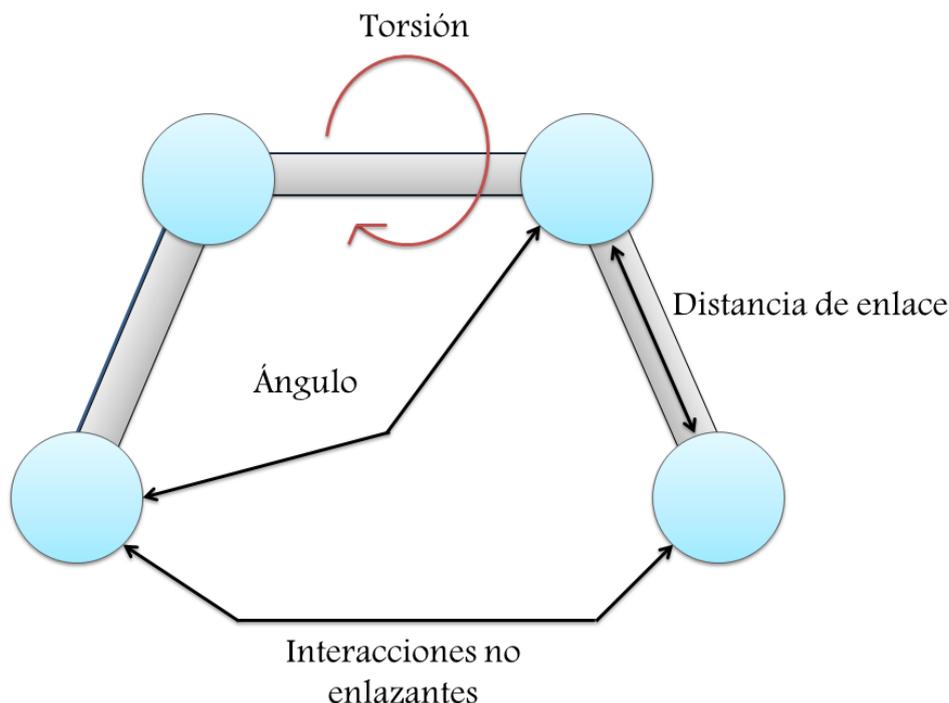


Figura 1.8: Esquema de las interacciones enlazantes y no enlazantes que se presentan en un campo de fuerzas de MM.

Simulación de Dinámica molecular

Cuando se quiere estudiar las propiedades estructurales y termodinámicas de sistemas macromoleculares que contienen puntos mínimos de energía, los métodos de simulación computacional nos permiten obtener una muestra representativa de las configuraciones de estos sistemas dadas ciertas condiciones. Existen dos grandes técnicas de simulación computacional: el método de Monte Carlo y las simulaciones de DM. Mientras que el primero se basa en analizar la energía de distintas coordenadas generadas de manera aleatoria, la DM permite generar una trayectoria de puntos que evoluciona con el tiempo siguiendo la leyes de movimiento de Newton. Se trata por tanto, de un método determinista, es decir, el estado de un punto de la trayectoria permite predecir el estado del siguiente punto⁶⁹.

Dada la fuerza en todos los átomos, las coordenadas se actualizan para el siguiente paso. Para minimizar la energía, el algoritmo de descenso más pronunciado simplemente mueve cada átomo una corta distancia en dirección de la energía decreciente (la fuerza es el gradiente negativo de energía), mientras que la dinámica molecular se realiza al integrar las ecuaciones de movimiento de Newton^{72,73}:

$$F_i = -\frac{\partial V(r_i, \dots, r_N)}{\partial R_i} \quad (1.2)$$

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i \quad (1.3)$$

donde F_i es la fuerza del átomo i ; V , representa la energía potencial del sistema debida a las posiciones de todas las partículas; R_i , son los vectores de posición; m_i , es la masa de los átomos y t representa al tiempo. Las coordenadas actualizadas se utilizan para evaluar nuevamente la energía potencial, como se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 1.9.

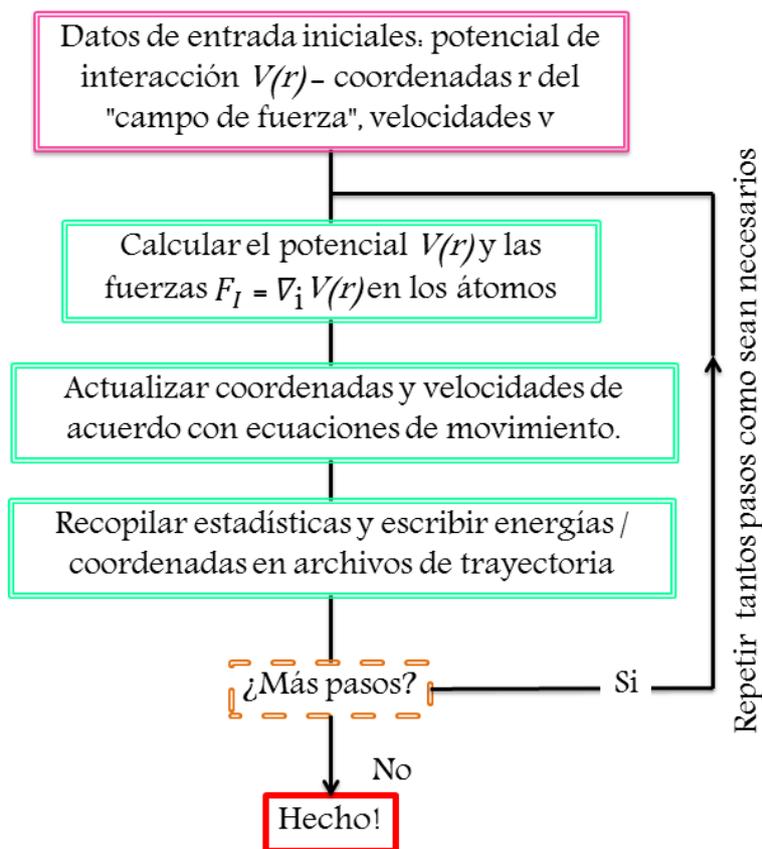


Figura 1.9: Diagrama de flujo simplificado de una simulación de DM típica. La idea básica es generar estructuras a partir de un conjunto natural calculando funciones potenciales e integrando las ecuaciones de movimiento de Newton, estructuras que luego se usan para evaluar las propiedades de equilibrio del sistema. Un paso de tiempo típico es del orden de 1 o 2 femtosegundos, a menos que se usen técnicas especiales.

Preparación y ejecución de una DM

Las simulaciones de DM se componen de dos etapas: una fase de equilibrado y una fase de producción. El objetivo del equilibrado es llevar al sistema a un estado de equilibrio a partir de la configuración inicial que puede provenir de datos experimentales (cristalografía de rayos X, NMR, etc.), de modelos teóricos o de una combinación de ambos. Es necesario primero hacer una optimización de la estructura para proceder a asignar las velocidades

iniciales a cada uno de los átomos. Esto se realiza de manera aleatoria a partir de una distribución Maxwell – Boltzmann a una determinada temperatura. Durante esta fase se monitorizan varios parámetros como la energía potencial, la temperatura y la densidad, hasta que se estabilizan.

Para conseguir un equilibrado óptimo, en ocasiones se aplican restricciones al sistema, liberándolas a continuación lentamente para permitir su adaptación a las condiciones deseadas. Para esto es preciso mantener fijas algunas de las condiciones de simulación; número de partículas (N), volumen (V), temperatura (T), presión (P) o energía total del sistema (E). Al combinarlas, se obtienen los diferentes ensambles estadísticos: microcanónico (NVE), isotérmico – isobárico (NPT) y canónico (NVT), siendo los ensambles NPT y NVT los más empleados en DM de proteínas y ácidos nucleicos. Este proceso suele durar entre 200 y 500 picosegundos aunque en ciertos casos conviene equilibrar el sistema durante varios nanosegundos.

Después de un correcto equilibrado, comienza la simulación conocida como de “producción” en la cual permitimos la evolución del sistema obteniendo una trayectoria que será analizada una vez terminada. Cuanto mayor sea el tiempo de simulación, se explorará más espacio conformacional y por lo tanto los resultados serían más precisos. En general se estima que el tiempo de simulación debería ser al menos diez veces más largo que la escala temporal del proceso a estudiar⁶⁹. Algunos de los indicadores de equilibrio estructural son los siguientes:

1. Raíz de la Desviación Cuadrática Media (RMSD)

Una de las propiedades fundamentales más importantes a analizar es si la proteína es estable y cercana a la estructura experimental. La forma estándar de medir esto es haciendo uso del desplazamiento cuadrático medio de todos los átomos (pesados o incluyendo a los hidrógenos), con respecto a la estructura experimental. También es posible calcular este RMSD de una molécula con respecto a una estructura de referencia. Para esto, se realiza primero un ajuste por mínimos cuadrados de la estructura dada a la configuración de referencia y luego, mediante el cálculo del RMSD, se estudia la desviación de la estructura respecto de esta primera. Este ajuste inicial se hace para evitar considerar en el análisis el movimiento de traslación y rotación de la molécula estudiada como un todo, y así poder considerar sólo los cambios conformacionales que en ella se producen. Puede calcularse el RMSD de toda la molécula de interés o de parte de ella, por ejemplo, es muy común el estudio del RMSD de los carbonos α al estudiar la estabilidad de proteínas.

2. Comparación de fluctuaciones (RMSF) con factores de temperatura (b-factor)

Las vibraciones alrededor del equilibrio no son aleatorias, sino que dependen de la flexibilidad de la estructura local. La fluctuación de la raíz cuadrada media (RMSF) de cada residuo es fácil de calcular a lo largo de la trayectoria, pero lo más importante es que se pueden convertir en factores de temperatura que también están presentes para cada átomo en un archivo PDB.

3. Estructura secundaria

Otra medida de estabilidad, es la estructura secundaria de la proteína. Esto se puede calcular para cada configuración de una simulación con un programa como DSSP. Si este programa está instalado y la variable de entorno DSSP leé archivos de trayectoria de salida, existen programas que pueden crear gráficos de estructura secundaria a través de toda la trayectoria de simulación.

4. Radio de giro (Rg) y enlaces de hidrógeno (H-bond)

También podemos tener una medida aproximada de cuán compacta es la estructura a estudiar y cómo cambia esa distribución de masa en función del tiempo analizando el radio de giro (Rg) de la molécula. Además se consideran que los enlaces de hidrógeno juegan un papel vital en el reconocimiento molecular y la estabilidad general de la estructura de la proteína⁷⁴.

1.6.5. Ensamble molecular

Podemos decir, en forma general, que los sistemas biológicos comparten un lenguaje común de comunicación basado en las interacciones que se establecen entre distintos tipos de moléculas como proteínas, ácidos nucleicos y entidades químicas de menor tamaño denominadas genéricamente ligandos. Generalmente las enfermedades están asociadas a un mal funcionamiento de estas interacciones, por lo que conocer cómo se producen nos permitiría interferir en ellas a través del uso de ligandos que disminuyan, o incluso anulen, los efectos de dichas enfermedades.

Los métodos teóricos, cuando están bien fundamentados e implementados, permiten seleccionar a partir de colecciones de millones de moléculas (quimiotecas), a aquellos candidatos que tienen una mayor probabilidad de interactuar con una diana terapéutica

dada. Este reducido conjunto puede analizarse experimentalmente y aquellos compuesto que den señal de interacción con la diana son denominados *hits*. En el caso de los fármacos, éstos pueden optimizarse hasta alcanzar los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos adecuados y convertirse así en *leads*.

Desde una perspectiva teórica, y dependiendo de la información estructural que tengamos a nuestra disposición, se pueden presentar cuatro escenarios distintos. El más favorable de todos es cuando tenemos información estructural de la diana y de alguno de sus ligandos, entonces se emplean técnicas de *docking* (ensamble molecular) y cribado virtual. Dos casos intermedios, que es cuando conocemos o la estructura general de algunos de los ligandos o de la diana, empleándose las técnicas de mapeo de farmacóforos. Por último, el caso más desfavorable que está caracterizado por la ausencia de cualquier información estructural, donde es necesario llevar a cabo estudios experimentales que nos den idea sobre el tipo de estructuras involucradas en la interacción, a fin de poder aplicar algún método teórico⁷⁵.

Docking molecular

En el estudio de las interacciones moleculares, muchas veces es necesario realizar técnicas de acoplamiento mejor conocidos como docking molecular. Para desarrollar estas técnicas son necesarios dos componentes principales:

1. Encontrar la estructura tridimensional de una diana de interés, por ejemplo una proteína, epítipo o bolsillo.
2. Encontrar la estructura tridimensional de un ligando, el cuál será acoplado a la diana para obtener diferentes estructuras del complejo proteína-ligando.

Dado que el ligando puede adoptar diversas posiciones dentro del sitio de unión de la proteína, la herramienta de docking consta, en primer lugar, de un método de muestreo (componente estructural), que enumera todas las configuraciones posibles ligando-receptor (poses). En segundo lugar, de una función matemática, llamada función de puntuación o *scoring*, que evalúa qué tan buenas son las interacciones existentes entre la proteína y el ligando en cada una de las poses (componente energética)⁷⁵.

Componente estructural

Es necesario un conocimiento previo de la estructura tridimensional tanto de la diana como del ligando. Por un lado, la estructura de la diana puede obtenerse por medio de diferentes métodos experimentales, principalmente cristalografía de rayos-X y espectroscopía

de Resonancia Magnética Nuclear (RMN); por métodos teóricos (modelado por homología), ambas metodologías disponibles en bancos de datos como el Protein Data Bank (PDB)⁶¹. Además, existen multitud de estructuras 3D de complejos receptor-ligando en el PDB, siendo éste una fuente importante de complejos de estructuras de interacción para probar los algoritmos del docking, ya que conocemos a priori cuál es el resultado final. La parte más importante de la estructura de la diana es la zona de unión del ligando, la cual puede ser un bolsillo, un sitio o centro activo, o cavidad de unión como se muestra en la Figura 1.10. La unión del ligando al centro activo produce una modificación, activación o inhibición de la respuesta fisiológica de la diana. Si conocemos dónde está situado el centro activo (por ejemplo a través de la estructura tridimensional de complejos diana-ligando determinada experimentalmente) podremos guiar al algoritmo de docking a una región en particular de la diana, en lugar de buscar en toda su superficie (docking ciego)⁷⁵.

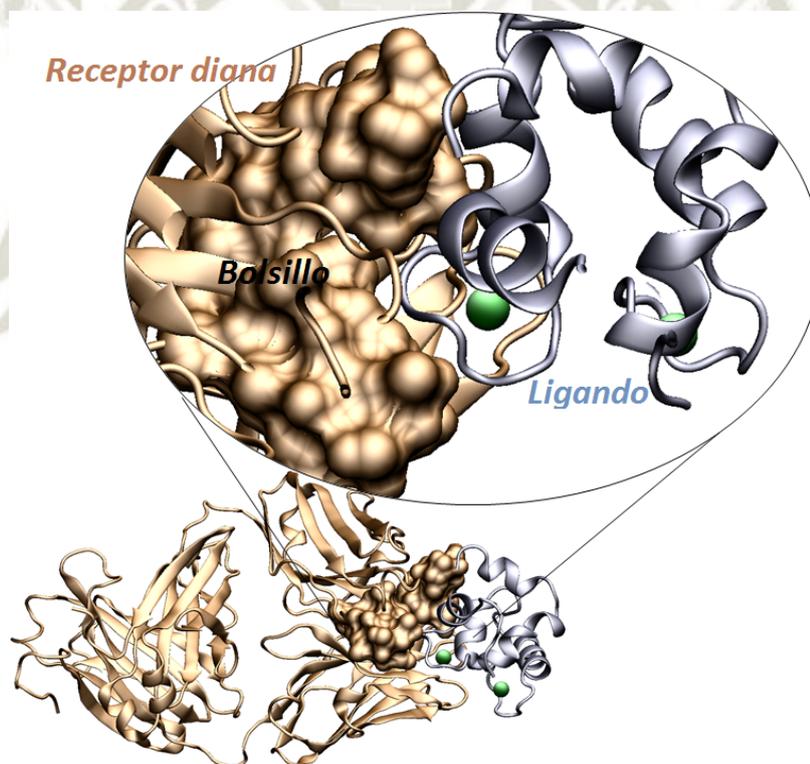


Figura 1.10: Complejo receptor-ligando, el centro activo o bolsillo del receptor diana está representado con una superficie y el ligando está representado con el método de dibujo NewCartoon.

Componente energética

Cuando se produce la unión entre el ligando y el centro activo de su diana, se establecen una serie de interacciones específicas que son las responsables de la estabilidad total del complejo. El éxito de un método de docking radica principalmente, en un conocimiento

profundo y una implementación apropiada de las fuerzas directrices que rigen la unión entre la diana y el ligando.

Los principales tipos de interacciones moleculares que se consideran fundamentales para entender y racionalizar la unión ligando-diana son las siguientes: interacciones de van der Waals (vdW), interacciones electrostáticas, interacciones por enlace de hidrogeno, interacciones del tipo puente salino, interacciones hidrofóbicas⁷⁵.

1. Interacciones de tipo van der Waals (vdW)

Cuando dos moléculas se aproximan y van entrando en contacto, las interacciones de vdW se manifiestan y se presentan dos tipos de fuerzas diferentes:

- a) Repulsión, la cual actúa a corta distancia debido al solapamiento o superposición de las nubes electrónicas de los átomos que se acercan.
- b) Atracción, que se da a larga distancia y es debida a la correlación entre los electrones de los diferentes átomos (fuerzas de dispersión de London), y se debe más a la forma (o volumen) que propiamente al contenido electrostático⁷⁵.

2. Interacciones electrostáticas

Las interacciones electrostáticas están presentes en la mayor parte de los procesos de unión ya sea interacciones carga-carga, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, de solvatación, etc⁷⁵.

Aproximación de Poisson-Boltzmann en el cálculo de energías libres (MM/PBSA)

Las energías libres de solvatación de un soluto, están asociadas al volumen desplazado de las moléculas de un solvente determinado. Estas energías pueden ser calculadas por varios métodos que incluyen el área superficial del soluto en contacto con el solvente. Una de las metodologías más usadas es la conocida como MM/PBSA la cual combina cálculos de mecánica molecular con métodos de solvatación de acceso del área superficial Poisson-Boltzmann^{76,77}. Esta metodología estima la energía libre de unión de pequeños ligandos a macromoléculas biológicas y por lo general, se basan en simulaciones de dinámica molecular del complejo receptor-ligando. Este método estima la energía libre utilizando un conjunto de estructuras en los estados inicial y final. En términos generales, la energía libre de unión de la proteína con el ligando en el solvente se puede expresar como:

$$\Delta G_{unión} = G_{complejo} - (G_{proteína} + G_{ligando}) \quad (1.4)$$

donde $G_{complejo}$ es la energía libre total del complejo proteína-ligando y $G_{proteína}$ y $G_{ligando}$ son las energías libres totales de la proteína aislada y el ligando en disolvente, respectivamente⁷⁸.

Además, la energía libre para cada entidad individual puede estar dada por

$$G_x = \langle E_{MM} \rangle - TS + \langle G_{solvación} \rangle \quad (1.5)$$

donde x es la proteína o ligando o el complejo proteína-ligando. $\langle E_{MM} \rangle$ es la energía potencial promedio de la mecánica molecular en el vacío. TS se refiere a la contribución entrópica a la energía libre en el vacío, donde T y S denotan la temperatura y la entropía, respectivamente. El último término $\langle G_{solvación} \rangle$ es la energía libre de solvatación⁷⁸. Los términos E_{MM} y $G_{solvación}$ se detallan a continuación.

1. Energía potencial de la mecánica molecular, E_{MM}

Este término incluye las energías debidas a las interacciones tanto enlazantes como no enlazantes, y se calcula con base en los parámetros del campo de fuerza de la mecánica molecular (MM). La ecuación para su cálculo es la siguiente:

$$E_{MM} = E_{enlazantes} + E_{noenlazantes} = E_{enlazantes} + (E_{vdW} + E_{elec}) \quad (1.6)$$

donde $E_{enlazantes}$ son las energías obtenidas por las interacciones de los átomos debidas a sus enlaces, ángulos, diedros y diedros impropios. El término $E_{noenlazantes}$ incluye todas aquellas interacciones electrostáticas E_{elec} y de van der Waals E_{vdW} que se modelan utilizando las funciones de los potenciales de Coulomb y Lennard Jones (LJ), respectivamente⁷⁸.

2. Energía libre de solvatación.

Este término es la energía necesaria para transferir un soluto del vacío al disolvente. En el enfoque MM/PBSA, se calcula utilizando un modelo de solvente implícito. La energía libre de solvatación se expresa como los siguientes dos términos

$$G_{solvación} = G_{polar} + G_{nopolar} \quad (1.7)$$

donde G_{polar} y $G_{nopolar}$ son las contribuciones electrostáticas y no electrostáticas a la energía libre de solvatación, respectivamente⁷⁸.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Detalles Computacionales

2.1.1. Hardware

Para la realización de este trabajo, se utilizó una estación de servicio del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular (CIIM). Este equipo trabaja sobre el sistema operativo UBUNTU de tipo 64 bits, que es un sistema operativo de código abierto y libre para computadores. UBUNTU es una distribución de Linux basada en Debian. El equipo cuenta con 62,7 GiB de memoria RAM y un procesador Intel® Xeon(R) CPU E5-2640 v3 @ 2.60GHz × 16, dos unidades de procesamiento gráfico GeForce GTX 1080 Ti/PCIe/SSE2, GNOME 3.32.1 además de un disco de 13,0 TB.

2.1.2. Base de datos

NCBI

El Centro Nacional de Información Biotecnológica promueve la ciencia y la salud al proporcionar acceso a información biomédica y genómica⁷⁹. Para la búsqueda de información, se utilizó esta base de datos ya que el NCBI está disponible en línea de manera gratuita y es accesibles usando su propio buscador *Entrez*. Así, de esta forma se pudo obtener la secuencia de aminoácidos en formato FASTA de la *Phl p 7* presente en el maíz registrado con el código LOCUS PWZ25322.

PDB

El *Protein Data Bank* (PDB) (Banco de Datos de Proteínas),⁶¹ es una base de datos que nos brinda información sobre las estructuras 3D de proteínas, ácidos nucleicos y

acoplamiento molecular complejo. Mediante esta base de datos se hizo la búsqueda de la proteína 2LVK, obtenida por espectroscopía de RMN. Su relevancia se debe a que es una estructura de *Phl p 7* de unión a calcio, lo que nos permitió obtener su estructura tridimensional y realizar un modelamiento por homología.

UniProt

La misión de UniProt⁸⁰ es proporcionar a la comunidad científica un recurso integral, de alta calidad y de libre acceso de secuencias de proteínas e información funcional. Al hacer una búsqueda de la *Phl p 7* de *Zea mays* en UniProt, ésta nos brindó una gran cantidad de datos con información simplificada, además de proporcionar los datos generales principales como la secuencia de aminoácidos, el nombre o la descripción de la proteína, los datos taxonómicos, investigaciones que se han realizado sobre esta proteína y agrega la mayor cantidad de información de anotaciones posibles.

2.1.3. Software

GROMACS 2020.3

GROMACS⁸¹⁻⁸³ es un paquete versátil para realizar simulaciones de alto rendimiento entre ellas, dinámicas moleculares. Para esto último, resuelve las ecuaciones de movimiento newtonianas para sistemas que van desde pocas partículas a millones de ellas. GROMACS está diseñado principalmente para el estudio de moléculas bioquímicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que tienen muchas interacciones de enlaces complicadas, por lo cual en esta investigación se utilizó este software.

UCSF Chimera

UCSF Chimera es un programa altamente utilizado para la visualización interactiva y el análisis de estructuras moleculares y datos relacionados, los que incluyen mapas de densidad, acoplamiento supramoleculares, alineaciones de secuencias, resultados de acoplamiento proteína-ligando, trayectorias y conjuntos conformacionales. Se pueden generar imágenes y animaciones de alta calidad⁶⁵.

Molden

Molden⁸⁴ es un programa general de procesamiento de estructuras moleculares y electrónicas. Este programa nos brinda varias herramientas, entre ellas, su capacidad para

editar la estructura de las proteínas y optimizar los modelos de éstas con la ayuda del paquete *Tinker*, lo que nos permitió poder obtener la estructura 3D de la *Phl p 7*.

VMD

VMD es un programa de visualización molecular para mostrar, animar y analizar grandes sistemas biomoleculares utilizando gráficos en 3D y secuencias de comandos integradas.⁶⁴

LigPlot

Es un programa que genera automáticamente diagramas de interacción ligando-proteína en 2D. Se ejecuta desde una interfaz Java que permite la edición en pantalla de los gráficos mediante operaciones de clic y arrastre de *mouse*⁸⁵. Este programa nos permitió observar las interacciones de la *Phl p 7* con la Inmunoglobulina E y las interacciones del calcio con el bucle.

PuTTY

PuTTY⁸⁶ es un programa con licencia libre, de cliente SSH, Telnet, rlogin, y TCP raw, que permite acceder a una computadora de manera remota, este programa permitió continuar con los diferentes cálculos que se debían hacer en las maquinas del CIIM.

WinSCP

WinSCP⁸⁷ es un programa de código libre, su función es facilitar la transferencia segura de archivos entre dos sistemas informáticos, el local y uno remoto que en este caso es nuestra computadora y los servidores del CIIM. Este programa fue utilizado en complementariedad con PuTTY para poder continuar con el estudio de la *Phl p 7*.

ConTEXT

ConTEXT⁸⁸ es un editor de texto gratuito pequeño, rápido y poderoso, que nos sirvió como herramienta para poder editar los archivos obtenidos, además de que nos brindó herramientas que no todos los editores de texto poseen.

APBS

APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) es un software que resuelve las ecuaciones de electrostática continua para grandes ensamblajes biomoleculares. Tiene la capacidad

para interactuar con otros paquetes computacionales y evolucionar a medida que los métodos y las aplicaciones cambian con el tiempo. El código APBS viene acompañado de una extensa documentación tanto para usuarios como para programadores y está respaldado por una variedad de utilidades para preparar cálculos y analizar resultados. Por último, la licencia APBS gratuita y de código abierto garantiza su accesibilidad a toda la comunidad científica⁸⁹.

2.1.4. Servidores

I-TASSER

El servidor I-TASSER es una plataforma en línea que implementa los algoritmos basados en *threading* iterativo para la predicción de estructuras de proteínas y sus funciones. Permite a los usuarios generar automáticamente estructuras tridimensionales de alta calidad, de moléculas que aún no se encuentran experimentalmente, a partir de sus secuencias de aminoácidos⁹⁰.

PDBsum

PDBsum⁹¹ es una base de datos que nos proporciona una descripción general del contenido de una estructura 3D depositada en el *Protein Data Bank* (PDB), además de que brinda al usuario la posibilidad de subir sus propias estructuras para su análisis. Esta herramienta es conocida como PDBsum Generate la cual nos permite generar un conjunto completo de análisis estructurales.

ProSA-web

ProSA-web es un servidor que permite reconocer errores en modelos experimentales y teóricos de estructuras de proteínas⁹², empleado en la validación de éstas. Este servidor calcula un puntaje de calidad general para una estructura de entrada específica. Si la puntuación esta fuera de un rango, característico de las proteínas nativas, es probable que la estructura contenga errores. Este servidor nos permitió validar la estructura obtenida y continuar con los siguientes análisis.

ElliPro

El servidor ElliPro permitió predecir los epítomos de la *Phl p 7* tanto lineales como discontinuos basados en la estructura 3D del antígeno proteico⁹³. Esta información brindada permitió poder dilucidar los posibles epítomos de la *Phl p 7*.

PatchDock

PatchDock es un algoritmo de acoplamiento molecular inspirado en las técnicas de reconocimiento de objetos y segmentación de imágenes. El acoplamiento se puede comparar como armar un rompecabezas es decir, intenta unir dos piezas eligiendo una y buscando la pieza complementaria⁹⁴⁻⁹⁶. Este servidor nos permitió obtener los posibles candidatos de interacción polcalcina-IgE que sirvieron para realizar las dinámicas moleculares.

FireDock

El servidor FireDock refina y califica según una función de energía a los diversos complejos moleculares. Esto permite hacer un refinamiento flexible a gran escala utilizando las estructuras de salida generadas con el servidor PatchDock. Para realizar este refinamiento FireDock toma las transformaciones generadas por PatchDock de los complejos proteína-ligando y les da un puntaje y los clasifica de acuerdo con la función de energía^{97,98}.

2.2. Descriptores de estructura

2.2.1. Diagrama de Ramachandran

El diagrama de Ramachandran muestra los ángulos de torsión phi-psi para todos los residuos en la estructura (excepto aquellos en los extremos de la cadena). El diagrama presenta varias regiones que simbolizan diferentes estructuras secundarias, la hélice alfa con giro a la derecha están simbolizadas por la letra A, la hoja beta está simbolizada por la letra B, la hélice alfa con giro a la izquierda está simbolizado por una L. Cada una de estas regiones contienen subregiones y dependiendo de los datos que arroja cada residuo, se le posiciona en la región correspondiente. El diagrama de Ramachandran del PDBsum está basado en 118 estructuras de resolución de al menos 2.0 ángstrom y un factor R no mayor a 20.0. Según estos parámetros, una proteína es considerada una estructura de buena calidad si el porcentaje de las regiones más favorecidas (A, B y L) supera el 90 %⁹¹.

2.2.2. Puntuación Z

Este tipo de gráficos muestra las puntuaciones de todas las cadenas experimentales del servidor PDB. Existen dos zonas de diferentes tonalidades de azul, la más clara muestra las estructuras obtenidas por difracciones de rayos-X y la oscura muestra las estructuras obtenidas por espectroscopía de RMN⁹².

2.2.3. Gráfico de puntuaciones de residuo

Esta gráfica de puntuaciones, muestra la calidad de la estructura representando las energías en función de la posición i de la secuencia de aminoácidos. Para la construcción de esta gráfica se calculan las energías promedio sobre cada fragmento de 40 residuos según la fórmula $s(i, i + 39)$, que luego se asignan al residuo “central” del fragmento en la posición $i + 19$ (línea gruesa de color verde). Una segunda línea de color verde claro, con un tamaño de ventana más pequeño de 10 residuos se muestra en el fondo del gráfico⁹².

2.3. Metodología

2.3.1. Modelado de la estructura terciaria de la proteína

El primer paso para este estudio, fue hacer una búsqueda en las bases de datos NCBI y PDB con el fin de encontrar información sobre la polcalcina *Phl p 7* presente en el maíz (*Zea Mays*). Después de una recopilación de información, se constató que la estructura cristalizada de la *Phl p 7* específica de maíz no se encontraba en la base de datos PDB. Sin embargo, al hacer la búsqueda en la NCBI, se encontró solo la secuencia en formato FASTA registrado con el código LOCUS PWZ25322. A partir del formato FASTA de una proteína se puede obtener su estructura terciaria utilizando diferentes herramientas, como es el modelamiento por homología.

Se introdujo la secuencia FASTA al programa BLAST, el cual arrojó que existía una polcalcina, conocida por el código 2LVK⁵¹, en la base de datos PDB la cual contaba con un 94.67% de identidad con nuestra *Phl p 7* de maíz. Mediante el programa MOLDEN que nos brinda la herramienta de editar y modelar estructuras proteicas, se pudo agregar y modificar los aminoácidos de la 2LVK y así obtener una estructura con la misma secuencia de aminoácidos que de la *Phl p 7* del maíz. A esta estructura la llamamos 1ZMP7 para este estudio, el número 1 identifica al primer modelo obtenido con estas técnicas de modelado, ZM sería la abreviatura de *Zea Mays* y P7 como identificar de la polcalcina estudiada *Phl p 7*.

2.3.2. Análisis de la estructura obtenida de la homología

La 1ZMP7 fue sometida a una análisis de su estructura, para esto se utilizaron dos servidores que fueron el PDBsum y el ProSA-web además del programa LigPlot. PDBsum nos brinda diferentes análisis detallados sobre la estructura secundaria de las macromo-

léculas a estudiar. Fue necesario analizar cada aspecto de la estructura secundaria para ver como ésta iba variando con respecto a las diferentes temperaturas evaluadas. Además, este servidor permitió obtener los diagramas de Ramachandran que brindó luces de si la estructura de la polcalcina era óptima y poseía valores acercados a la realidad.

El servidor ProSA-web, mediante la puntuación Z y un gráfico de puntuaciones de residuos, permitió corroborar los datos obtenidos en el diagrama de Ramachandran y saber si esta estructura es óptima.

Finalmente, se utilizó el programa LigPlot para analizar el dominio *EF-hand*, en especial el bucle que son los aminoácidos que están relacionados con el calcio. Para utilizar este programa, es necesario introducir la estructura en formato pdb y así evaluar las interacciones y distancias de los iones calcio, tanto para el primer bucle comprendido entre los aminoácidos 15 al 26 y para el segundo bucle formado por los aminoácidos 50 al 61.

2.3.3. Simulación de dinámica molecular

Para las diferentes simulaciones de dinámica molecular se utilizó la estructura 1ZMP7 obtenida del modelamiento por homología, la cual sirvió como estructura de partida para las simulaciones. Los cálculos se realizaron con el paquete GROMACS 2020.3 utilizando el campo de fuerza en su versión todos los átomos OPLS-AA/L. Para evitar problemas con las condiciones periódicas, se construyeron cajas de simulación en las que se aseguraban que todos los átomos estuvieran a por lo menos 1.0 nm del borde de la caja y éstas fueron solvatadas por moléculas de agua de modelo rígido TIP4P de cuatro puntos. Se añadieron iones necesarios para neutralizar la carga neta en la proteína. Antes de comenzar la dinámica molecular, se aseguró que los sistemas no presentaran choques estéricos o geometrías inapropiadas. Para esto, las diferentes estructuras se relajaron utilizando un proceso de minimización de energía. Esta minimización se llevó a cabo utilizando el método de *steepest descent* el cual evalúa las fuerzas debidas a las posiciones atómicas modificando estas posiciones, hasta alcanzar un mínimo de energía. Con las estructuras obtenidas se hizo un análisis utilizando nuevamente los servidores PDBsum y ProSA-web y el programa LigPlot.

Para las dinámicas moleculares en general, se utilizó el acoplamiento de temperatura *V-rescale* y el acoplamiento de presión Parrinello-Rahman a fin de mantener a los sistemas en un entorno estable a las temperaturas deseadas (290.15 K, 310.15 K, 331.05 K, 350.45 K, 370.45 K) y a presión de 1 bar. Las constantes de acoplamiento se establecieron en 0.1 y 2.0 ps para la temperatura y la presión, respectivamente. Se empleó el algoritmo de Particle Mesh Ewald (PME) para evaluar las interacciones electrostáticas de largo alcance

y de Van der Waals. El radio de corte para las interacciones de VdW de corto alcance (r_{vdw}) y las coulómbicas ($r_{coulomb}$), se estableció en 1.0 nm.

Todas las longitudes de enlace se restringieron mediante el algoritmo LINCS y el intervalo de tiempo se estableció en 0.001 ps. La estructura se equilibró durante 100ps en los ensambles NPT y NVT. Finalmente, se realizó una simulación de dinámica molecular conocida como “de producción” de 500 ns para las diferentes temperaturas evaluadas. Las trayectorias se almacenaron cada 10 ps y se calcularon diferentes descriptores de estructura como el RMSD (desviación cuadrática media), RMSF (fluctuaciones cuadráticas medias), radio de giro, enlaces de hidrógeno de los sistemas, al finalizar las simulaciones. Todos los átomos de la 1ZMP7 se incluyeron en estos cálculos.

2.3.4. Acoplamiento molecular

Todos los acoplamientos moleculares realizados en este trabajo se hicieron utilizando como receptor diana a la inmunoglobulina E (IgE) y como ligando a la *Phl p 7*. El primer paso fue obtener la estructura de la IgE, la cual fue obtenida del Protein Data Bank registrada con el código 5OTJ⁹⁹. De esta estructura solo deseábamos conservar la región Fab, la cual posee el sitio de unión a un antígeno, también llamada región determinante de complementariedad (CDR). Se utilizó el programa UCSF Chimera para limpiar y completar la estructura y para obtener el formato pdb con la región Fab. Una vez completada, se procedió a hacer una minimización energética para evitar choques estéricos debidos a la adición de los nuevos residuos. Con esta estructura de la IgE se procedió a realizar los acoplamientos moleculares entre ésta y las diferentes estructuras obtenidas después de someter a la 1ZMP7 a las distintas temperaturas (290.15 K, 310.15 K, 331.05 K, 350.45 K, 370.45 K). Para este estudio se utilizó el algoritmo PatchDock que generó una lista de transformaciones para las distintas soluciones de acoplamiento candidatas las cuales fueron enviadas al servidor FireDock.

Para discernir aquellos complejos que se estudiarían para analizar la interacción *Phl p 7*-IgE, se escogieron dos estructuras cuaternarias por cada acoplamiento a las temperaturas analizadas, dando un total de 10 complejos moleculares. Éstos fueron seleccionados basados principalmente en la energía global, datos que brinda FireDock, así como en el *score*, la penetración y el área de contacto, datos que brinda PatchDock. Adicionalmente se analizaron las estructuras con el servidor PDBsum para contabilizar los contactos que se presentaban en estos complejos. Entre los datos contabilizados se encuentran el número de enlaces de hidrógeno, los puentes salinos y los contactos no enlazantes. Estos datos se compararon con las estructuras resultantes posteriores a la dinámica molecular.

2.3.5. Simulación de dinámica molecular de las estructuras cuaternarias

Las 10 estructuras cuaternarias obtenidas del acoplamiento molecular, las cuales serán referidas como “soluciones”, fueron sometidas a un proceso de estabilización utilizando simulaciones de DM. Los cálculos se realizaron con el paquete GROMACS 2020.3 utilizando el campo de fuerza en su versión todos los átomos OPLS-AA/L. Para obtener las dimensiones de la caja de simulación se construyó un programa basado en fortran, el cual busca las coordenadas de los átomos más alejados en x , y y z y partir de estas coordenadas generar una distancia de 1.5 nm con el borde la caja (Figura A.1. Este tamaño de las cajas de simulación se usó para reducir el número de moléculas de agua en la solvatación y de esta forma reducir el costo computacional de cada simulación. El modelo de agua utilizada para la solvatación fue el modelo rígido de cuatro puntos TIP4P, haciendo uso de las condiciones periódicas de contorno. Se añadieron los iones necesarios para neutralizar la carga neta en la proteína. Los parámetros de simulación utilizados en estas nuevas DM fueron los mismos mencionados previamente a excepción de la temperatura y el tiempo de simulación, los cuales fueron de 310.15 K y 100 ns respectivamente, en todos los casos.

Se calcularon los diferentes RMSD de las estructuras para evaluar la estabilidad de los complejos, además de realizar diferentes análisis de las interacciones inter-residuales. Adicionalmente, se hizo un estudio de los componentes de la energía libre de unión mediante el método MM/PBSA con la respectiva contribución energética de cada residuo, esto con el fin de evaluar la fuerza de interacción entre la IgE y la *Phl p 7* de *Zea Mays*.

2.3.6. Análisis de energías por la metodología de MM/PBSA

La energía libre de unión (ΔG_{bind}) se estimó promediando las energías de enlace para las estructuras de cada *frame* obtenidas en un intervalo de 0.5 ns de las simulaciones de DM en la región estable para cada uno de los sistemas. Estas regiones fueron determinadas haciendo uso de los gráficos de RMSD, lo que permitió asegurar que los cálculos de las energías fueran obtenidos con mayor precisión. Se obtuvieron tres componentes energéticos, (a) energía potencial en el vacío, (b) energía de solvatación polar y (c) energía de solvatación no polar para cada una de las interacciones *Phl p 7*-IgE .

Para calcular la energía de enlace promedio, la metodología `g_mmpbsa` proporciona un script escrito en lenguaje Python (`MmPbSaStat.py`) que debe ser ejecutado sobre una terminal en LINUX, obtuyéndose dos archivos de salida “`full_energy.dat`” y “`summary_energy.dat`” (Figura A.2). Estos dos archivos contienen las desviaciones promedio

y estándar de todos los componentes energéticos, incluida la energía de enlazamiento.

También es posible calcular la contribución promedio de cada uno de los residuos en las energías de enlazamiento. Para este paso, se hace uso del script en Python `MmPbSaDecomp.py`, con el cual se obtienen dos archivos identificados como “`final_contrib_energy.dat`” y “`energyMapIn.dat`”, donde el primero contiene la energía de contribución de los tres términos energéticos y sus valores promedio incluyendo su error estándar (sin desviación estándar), además incluida la energía de enlace para cada residuo. El segundo archivo permite graficar estas energías en formato *xy* haciendo uso de programas como `XmGrace`.

Para visualizar de forma tridimensional la contribución de cada residuo en la interacción proteína-ligando, el programa `g_mmpbsa` utiliza los archivos `pdb` reemplazando la columna del factor-B por las energías obtenidas en los cálculos. Para generar los archivos de visualización (`complex.pdb`, `subunit_1.pdb` y `subunit_2.pdb`) es necesario utilizar la herramienta `energy2bfac`. Donde `subunit_1.pdb` y `subunit_2.pdb` son los archivos de estructura `pdb` para la *Phl p 7* y el segundo para la *IgE*. Finalmente se visualizaron estos archivos utilizando `VMD`.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Estructura de la Phl p 7 específica de *Zea mays*

3.1.1. Estructura de la proteína

Estructura primaria

La secuencia de aminoácidos de la *Phl p 7* específica de *Zea Mays* cuenta con 80 aminoácidos, comienza en la metionina y finaliza con una fenilalanina como se visualiza en la Figura 3.1. Para todos los análisis realizados se consideró la secuencia completa de la polcalcina sin ninguna modificación.

Un aspecto importante a resaltar es que las cadenas laterales de los aminoácidos en la secuencia primaria son químicamente diferentes, lo que hace que cada proteína sea distinta y posea una diferente función biológica¹⁰⁰. En este estudio se obtuvo una estructura de la *Phl p 7* a partir de una plantilla de la *Phleum pratense* (2LVK). Aunque presenta una secuencia de aminoácidos muy parecida no son las misma proteína, como se ve en la Figura 3.2, la mayor diferencia entre las dos estructuras se encuentra en el extremo portador del grupo amino libre (NH₃⁺). Por lo que aunque las dos sean del tipo *Phl p 7*, ambas proteínas tienen funciones biológicas distintas con propiedades químicas diferentes.

```
Phl p 7
1 MAATADMERI FKRFDITNGDG KISLSELTEA LRTLGSITSAD EVQRMMAEID TDGDGCIDFN
61 EPITFSNANP GLMKDVARVF
```

Figura 3.1: Phl p 7 fasta

```

Phlp7-[Zea_mays]      MAATADMERIFKRFDTNGDGKISLSELTEALRTLGGSTSADEVQRMMAEIDTDGDGCIDFN      60
2LVK                  ---ADDMERIFKRFDTNGDGKISLSELTALRTLGGSTSADEVQRMMAEIDTDGDFIDFN      57
                        : *****
Phlp7-[Zea_mays]      EFITFSNANPGLMKDVAKVF      80
2LVK                  EFISFCNANPGLMKDVAKVF      77
                        ***:*****
    
```

Figura 3.2: Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de la *Phl p 7* (*Zea Mays*) y 2LVK, obtenidas usando el servidor Clustal Omega. Un (*) indica posiciones que tienen un solo residuo completamente conservado, (:) indica conservación entre grupos de propiedades muy similares y (.) indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Estructura secundaria

Las estructuras secundarias que contiene la *Phl p 7*, son el resultado del plegamiento de la cadena aminoacídica y la estabilización debida a los enlaces de hidrógeno que permiten la formación de hélices α y hojas β . En el caso de esta proteína, presenta 5 hélices α , 8 interacciones de hélice – hélice, 4 giros β y 1 giro γ .

Como se observa en la Figura 3.3, las hélices están representadas con una letra H mayúscula, los giros β y γ con las letras griegas respectivas. Un dominio proteico representativo serían las *EF-hand* que presenta la proteína, en este caso como es un monómero presenta dos *EF-hand*, este dominio es el que contiene al calcio.

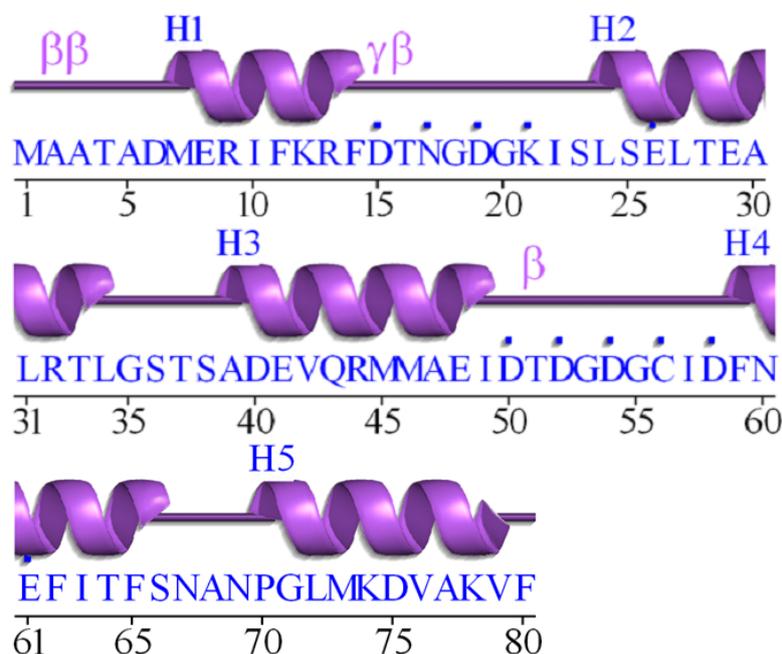


Figura 3.3: Estructura secundaria de la *Phl p 7* (*Zea mays*), H representa las α hélices, γ y β los giros respectivos. Esta figura fue obtenida del servidor PDBsum.

1. Hélice α

Las hélices α mantienen su forma gracias a las interacciones del tipo enlace de hidrógeno entre los átomos de oxígeno del grupo carbonilo de un aminoácido y el átomo de hidrógeno del grupo amino de otro aminoácido situado a cuatro enlaces peptídicos de distancia en la cadena. Esta conformación se repite cinco veces en nuestra proteína. En la Tabla 3.1 se muestra los aminoácidos inicial y final de cada hélice α así como el número de aminoácidos que las constituyen y su secuencia aminoacídica.

Hélices α					
No.	Comienzo	Final	Tipo	No. de residuo	Secuencia
1.	Met7	Phe14	H	8	MERIFKRF
2.	Leu24	Leu34	H	11	LSELTEALRTL
3.	Ala39	Ile49	H	11	ADEVQRMMAEI
4.	Phe59	Ser66	H	8	FNEFITFS
5.	Pro70	Val79	H	10	PGLMKDVAKV

Tabla 3.1: Hélices α presentes en la *Phl p 7* de *Zea mays*

2. Giro β

Los giros β se forman por la interacción de enlace de hidrógeno entre los residuos i e $i+3$. Son elementos de la estructura secundaria que causan un cambio en la dirección de la cadena polipeptídica lo que permite que la proteína se pliegue sobre sí misma. En la estructura de la *Phl p 7* se presentan cuatro giros β , lo que le da esa conformación globular a la proteína. En la Tabla 3.2 podemos ver los residuos que conforman cada uno de los giros, su secuencia de residuos y la medida de los ángulos Psi (ψ), Phi (ϕ) y Chi (ξ), además de que se muestra si hay presencia de enlaces de hidrógeno.

Giro β									
No.	Giro	AA	Residuo $i+1$			Residuo $i+2$			Enlace -H
			ϕ	ψ	ξ	ϕ	ψ	ξ	
1.	Met1-Thr4	MAAT	-58.1	-47.0	-	-58.0	-47.0	-	Si
2.	Ala2-Ala5	AATA	-58.0	-47.0	-	-58.0	-47.0	62.0	Si
3.	Asp15-Gly18	DTNG	-57.3	-21.4	-68.3	-82.6	-12.0	167.0	No
4.	Asp50-Gly53	DTDG	-73.4	-25.9	-60.2	114.2	-13.7	24.9	Si

Tabla 3.2: Giros β presentes en la *Phl p 7* de *Zea mays*

3. Giro γ

Un giro γ , es un elemento de la estructura secundaria presente en nuestra proteína, donde la cadena polipeptídica invierte su dirección general. En este giro se produce el enlace de hidrógeno entre los residuos i e $i \pm 2$. La *Phl p 7* solo presenta un giro γ dentro de toda la estructura, en la Tabla 3.3 se puede visualizar en donde comienza y termina el giro, la secuencia de aminoácidos y la medida de los ángulos ψ , ϕ y ξ .

Giro γ						
No.	Comienzo	Final	Secuencia	Residuo $i+1$		
				ϕ	ψ	ξ
1.	Phe14	Thr16	F D T	-91.1	62.9	-177.5

Tabla 3.3: Giro γ presente en la *Phl p 7* de *Zea mays*

Dominio *EF-hand*

La *Phl p 7* consta de dos dominios estructurales hélice - bucle - hélice, este dominio es representativo de la familia de proteínas de unión al calcio. Las *EF-hand* constan de dos hélices α unidas por una región de bucle corto formada por 12 residuos, este bucle es donde están unidos los calcios. En el caso del primer bucle, comprendido entre el Asp15 y Glu26, los residuos que han creado una interacción electrostática con el calcio son los siguientes: el Asp15, Asn17, Asn19, Lys21 y el Glu26, como se visualiza en la Figura 3.4. Las distancias entre estos residuos y el calcio están registrados en la Tabla 3.4. Como puede observarse son los oxígenos los que generan estas interacciones electrostáticas y las distancias entre estos átomos y el calcio no supera los tres ángstroms.

En el caso del segundo bucle, que está comprendido entre el Asp50 y el Glu61, son cinco los residuos que han creado una interacción electrostática con el calcio como se visualiza en la Figura 3.4, entre ellos está el Asp50, Asp51, Asp54, Cys5 y el Glu61. Las distancias entre estos residuos y el calcio están registrados en la Tabla 3.5. Como se ve, nuevamente son los oxígenos los que generan estas interacciones electrostáticas y las distancias entre estos átomos y el calcio no supera los tres ángstroms.

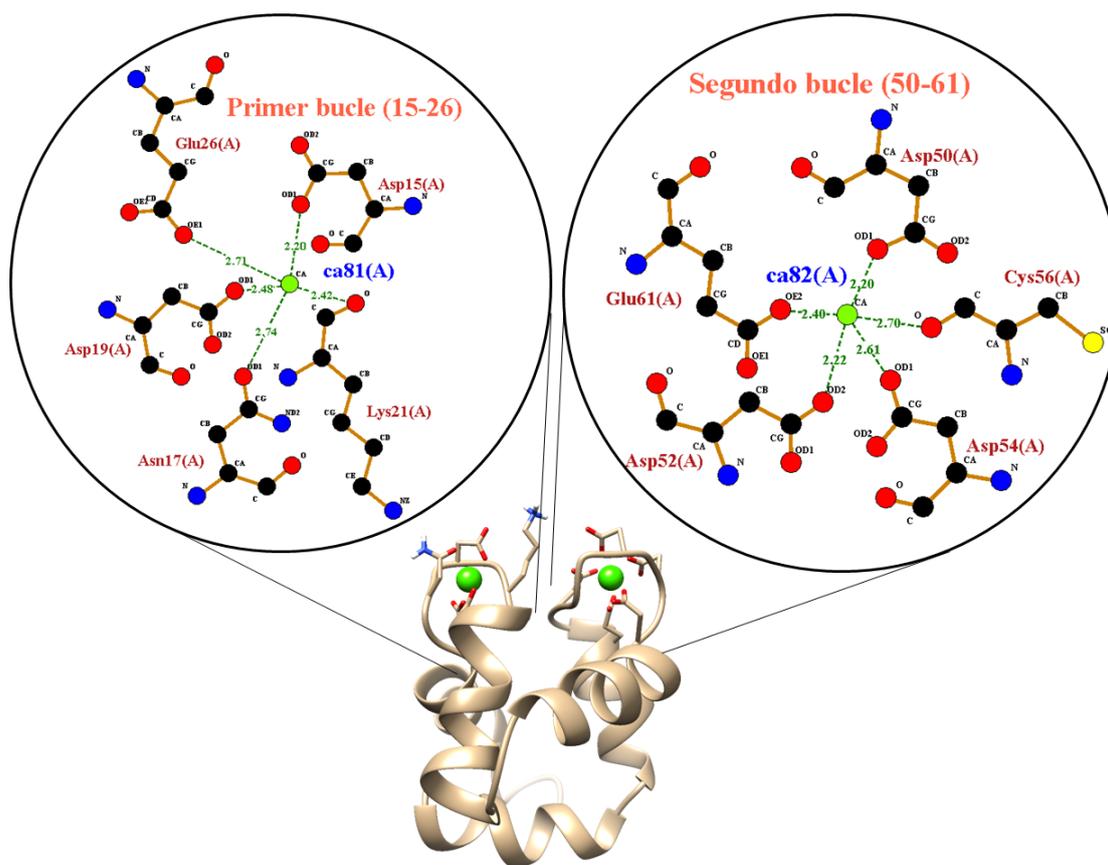


Figura 3.4: Dominio EF-hand. La *Phl p 7* consta de dos dominios *EF-hand* conformados por dos hélices α y un bucle. En el primer bucle son cinco residuos que generan interacciones electrostáticas con el calcio igual que en el segundo bucle. El calcio está representado por un círculo verde y las interacciones electrostáticas por una línea punteada verde.

Interacciones electrostáticas									
Átomo 1				Átomo 2				Dist. Å	
N°	N.	N.	N°	N°	N.	N.	N°		
ATM	ATM	Res.	Res.	ATM	ATM	Res.	Res.		
241	OD1	Asp	15	<->	1199	CA	CA	81	2.20
268	OD1	Asn	17	<->	1199	CA	CA	81	2.74
288	OD1	Asp	19	<->	1199	CA	CA	81	2.48
304	O	Lys	21	<->	1199	CA	CA	81	2.42
390	OE1	Glu	26	<->	1199	CA	CA	81	2.71

Tabla 3.4: Primer bucle. Descripción de las interacciones electrostáticas. La tabla muestra el número del átomo, nombre del átomo, nombre del residuo y finalmente el número del residuo que interactúa con el calcio en el primer bucle, el calcio ocupa la posición número 81 en el formato pdb. Finalmente se visualizan las distancias entre el calcio y los átomos de los residuos con los cuales interactúa.

Interacciones electrostáticas									
Átomo 1				Átomo 2				Dist. Å	
N°	N.	N.	N°	N°	N.	N.	N°		
ATM	ATM	Res.	Res.	ATM	ATM	Res	Res.		
752	OD1	Asp	50	<->	1200	CA	CA	82	2.20
780	OD2	Asp	52	<->	1200	CA	CA	82	2.22
798	OD1	Asp	54	<->	1200	CA	CA	82	2.61
814	O	Cys	56	<->	1200	CA	CA	82	2.70
895	OE2	Glu	61	<->	1200	CA	CA	82	2.40

Tabla 3.5: Segundo bucle. Descripción de las interacciones electrostáticas. La tabla muestra el número del átomo, nombre del átomo, nombre del residuo y finalmente el número del residuo que interacciona con el calcio en el segundo bucle, el calcio ocupa la posición número 82 en el formato pdb. Finalmente se visualizan las distancias entre el calcio y los átomos de los residuos con los cuales interacciona.

Estructura terciaria

Finalmente, después de hacer el modelamiento por homología, se obtuvo la conformación tridimensional que forma la cadena aminoacídica, que se denomina habitualmente estructura terciaria. Como se visualiza en la Figura 3.5, la *Phl p 7* presenta una conformación globular en la que se pueden visualizar las dos *EF-Hand* con sus respectivos calcio en los bucles.

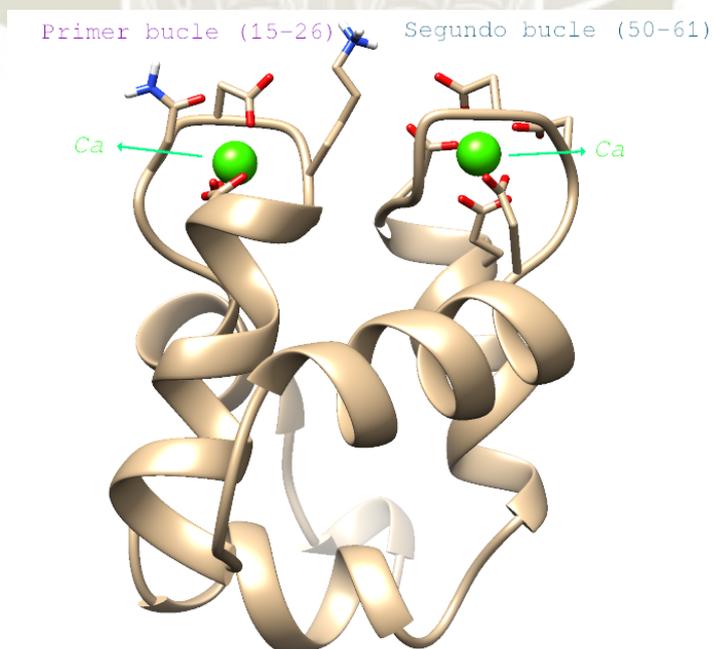


Figura 3.5: Estructura de la *Phl p 7* obtenida por modelamiento por homología.

3.1.2. Análisis de la estructura final obtenida

Diagrama de Ramachandran

El servidor PDBsum arrojó los siguientes datos: de los 80 residuos, 59 estaban en las regiones favorecidas (A, B y L), estas regiones simbolizadas con letras mayúsculas, son regiones rojas que corresponden a las regiones centrales que representan las combinaciones más favorables para valores ϕ - ψ . Estos 59 residuos representa un 83.1 % como se visualiza en el Anexo A.3.

En las regiones permitidas (a, b, l, p) están presentes 12 residuos que equivalen a un 16.9 % del total. En las regiones permitidas generosamente y no permitidas, no se encontró ningún residuo. Este análisis fue basado en 118 estructuras de resolución de al menos 2.0 ángstrom y un factor R no mayor a 20.0. Según estos parámetros, es considerada una estructura de buena calidad si el porcentaje de las regiones más favorecidas (A, B y L) supera el 90 %, sin embargo en este caso este porcentaje no es superado y la razón es debida a que hay choques estéricos entre los átomos de los residuos, lo que significa que algunos de los ángulos ϕ y ψ no son posibles.

Entre los átomos de los residuos involucrados en los contactos defectuosos (así llamados a todo el par de átomos enlazados que se encuentren a una distancia menor de 2.6 ángstrom entre sí), encontramos a los átomos de los residuos Asp5, Asp6, Arg9, Asp19, Lys21, Glu26, Asp50, Asp52, Asp54, Cys56, Asp58, Glu61, estos datos están en la Tabla 3.6. La mayoría de estos residuos están unidos al calcio, sin embargo los diagramas de Ramachandran solo evalúan residuos y no consideran al calcio, por lo que estas interacciones electrostáticas generan ángulos ϕ - ψ no favorables.

Contactos defectuosos									
Residuo 1				Residuo 2				Tipo de contacto	
N°	Cadena	Tipo	ATM	N°	Cadena	Tipo	ATM		
6	A	Asp	OD2	->	9	A	Arg	CZ	S-S
15	A	Asp	OD1	->	21	A	Lys	O	S-M
15	A	Asp	OD1	->	26	A	Glu	OE1	S-S
15	A	Asp	OD1	->	81	A	CA	CA	S-H
19	A	Asp	OD1	->	81	A	CA	CA	S-H
21	A	Lys	O	->	26	A	Glu	OE1	M-S
21	A	Lys	O	->	81	A	CA	CA	M-H
50	A	Asp	OD2	->	56	A	Cys	O	S-M
50	A	Asp	OD1	->	61	A	Glu	OE2	S-S
50	A	Asp	OD1	->	82	A	CA	CA	S-H
52	A	Asp	OD2	->	82	A	CA	CA	S-H
54	A	Asp	OD1	->	82	A	CA	CA	S-H
58	A	Asp	OD2	->	61	A	Glu	OE1	S-S
61	A	Glu	OE2	->	82	A	CA	CA	S-H

Tabla 3.6: Contactos defectuosos. Estos contactos se dan entre dos residuos. En la tabla se visualiza el tipo de residuo, el átomo interactuante, el número de residuo y la interacción que se da entre estos dos pares de residuos. Hay tres tipos de contacto, la primera es cadena lateral con cadena lateral (S-S), cadena lateral con cadena principal (S-M), y finalmente cadena lateral con los átomos que están en la sección HETATM del formato pdb, que en este caso sería los calcio (S-H).

ProSA-Web

ProSA-Web nos arroja dos datos, la puntuación Z y el gráfico de puntuaciones de residuo. En la puntuación Z se obtuvo un Z -score de -7.02 como se visualiza en Apéndice A.4. El gráfico muestra las puntuaciones de todas las cadenas experimentales de la base de datos PDB. En este caso, nuestra estructura se visualiza como un punto negro dentro de la región RMN (azul oscuro) y la región de rayos-X (azul claro), esto quiere decir que nuestra estructura está dentro del rango de puntuaciones que se encuentran típicamente para proteínas nativas registradas.

La gráfica de puntuaciones de residuos muestra la calidad de la estructura representando las energías en función de la posición i de la secuencia de aminoácidos. En el Apéndice A.5 se visualiza que ningún dominio de la estructura presenta partes problemáticas o erróneas ya que no se visualiza valores positivos. La gráfica muestra en un color verde oscuro el análisis que hizo el servidor a 40 aminoácidos, como puede observarse los valores presentados son negativos. Finalmente la línea más delgada y de color verde claro

(que son 10 aminoácidos evaluados de la proteína), también muestra valores negativos. En general el servidor ProSA-web mostró resultados óptimos con respecto a la estructura obtenida, estos resultados confirman que la estructura que se utilizará para hacer los posteriores estudios, es una estructura con valores confiables y que puede ser encontrada en la naturaleza.

3.2. Minimización de la estructura por el método de *Steept Descent*

3.2.1. Estructura secundaria

Después de someter la *Phl p 7* a una minimización de energía, se obtuvo una conformación ligeramente diferente a la inicial, esta consta de seis hélices α , nueve interacciones hélice – hélice, dos giros β , un giro γ , y se dio la aparición de una hoja β que consta de dos hebras y una horquilla β .

Como se observa en la Figura 3.6, las hélices α están representadas por una H mayúscula y en este caso va desde la H1 hasta la H6. Los giros β y γ , están simbolizadas con las letras griegas respectivas. El código de una letra de los residuos que están en contacto con el calcio tienen un pequeño cuadrado encima. En el caso de la hoja β , se pueden diferenciar dos elementos, las hebras están representadas por una flecha y una letra A mayúscula, asimismo la horquilla β está representada por unas líneas paralelas rojas.

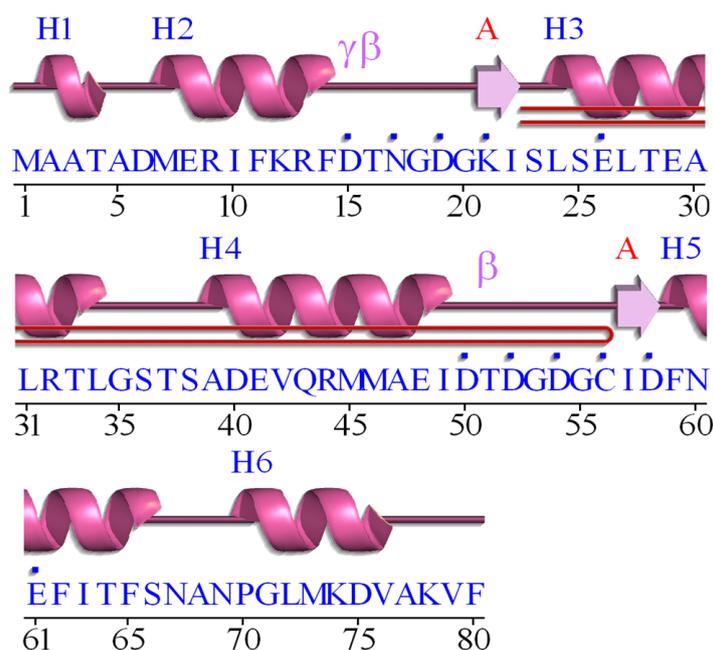


Figura 3.6: Estructura secundaria de la *Phl p 7*. Las hélices α son representadas por letras H; la hoja β por letras A, γ y β los giros respectivo y finalmente los residuos en contacto con el metal con un pequeño cuadrado azul. Imagen obtenida del PDBsum.

Hoja β

Después de la minimización se visualizó la aparición de una hoja β , que consta de dos hebras, esta hoja beta es de tipo antiparalelo, como se muestra en la Tabla 3.7. Cada hebra está presente en cada bucle de la proteína, la hebra uno está comprendida entre la Lys21 y Ile22, la segunda hebra está comprendida entre la Ile57 y Asp58, ambas con una longitud de dos residuos. La horquilla β que se forma es de clase 34:34 ya que hay 34 aminoácidos entre cada hebra como se muestra Tabla 3.8.

Hoja β			
Hoja β	N° de hebras	Tipo	N° hojas β
A	2	Antipararelo	1

Tabla 3.7: Hoja β . Está simbolizada por una A y consta de dos hebras del tipo antiparalelo.

Horquilla β							
N°	Hebra 1			Hebra 2			Horquilla clase
	Inicio	Final	Long.	Inicio	Final	Long.	
1	Lys21	Ile22	2	Ile57	Asp58	2	34:34

Tabla 3.8: Horquilla β . Presenta dos hebras y es de tipo 34:34

Hélice α

La estructura después de la minimización posee seis hélices α . En comparación con la estructura obtenida después del modelamiento por homología, posee una hélice α más que se encuentra al inicio de la cadena. Ésta comienza en la Ala2 y finaliza en la Thr4 donde participan 3 residuos, como se visualiza en la Tabla 3.9. En comparación con la estructura inicial, sigue manteniendo las mismas hélices conservando las posiciones de los residuos, a excepción de la primera que no había anteriormente y la sexta, donde hay una reducción de su secuencia de residuos, ya que ahora empieza en la Pro70 y finaliza en la Val76 poseyendo un total de siete residuos.

Hélices α					
No.	Comienzo	Final	Tipo	No. de residuo	Secuencia
1.	Ala2	Thr4	G	3	AAT
2.	Met7	Phe14	H	8	MERIFKRF
3.	Leu24	Leu34	H	11	LSELTEALRTL
4.	Ala39	Ile49	H	11	ADEVQRMMAEI
5.	Phe59	Ser66	H	8	FNEFITFS
6.	Pro70	Val76	H	7	PGLMKDV

Tabla 3.9: Hélice α . Se muestra las seis hélices α presentes en la estructura de la *Phl p 7*; residuo inicial y final de cada hélice su tipo, el número de residuos que las conforman y su secuencia aminoacídica.

Giro β

La estructura presenta solamente dos giros β que se encuentran en cada uno de los bucles. El primer giro está comprendido entre el Asp15 y la Gly18, este giro no presenta ningún enlace de hidrógeno, como se muestra en la Tabla 3.10. En el caso del segundo giro, éste está comprendido entre el Asp50 y la Gly53, este giro sí tiene un enlace de hidrógeno. Ambos giros constan de cuatro residuos, y en comparación con la estructura inicial, la estructura obtenida después de la minimización presenta dos giros β menos.

Giro β									
No.	Giro	AA	Residuo i+1			Residuo i+2			Enlace -H
			ϕ	ψ	ξ	ϕ	ψ	ξ	
1.	Asp15-Gly18	DTNG	-57.3	-38.2	-65.1	-71.5	-18.1	-178.7	No
2.	Asp50-Gly53	DTDG	-67.6	-33.2	-65.4	-97.4	-19.8	14.1	Si

Tabla 3.10: Giro β . Se visualiza el inicio y final de los giros β , la secuencia de residuos, los ángulos ϕ , ψ y ξ del segundo y tercer residuo.

Giro γ

El giro γ sigue manteniéndose después de la minimización. Conformado por tres residuos, éste comienza en la Phe14 y termina en la Thr16, como se visualiza en la Tabla 3.11. Finalmente tenemos los ángulos ϕ , ψ y ξ del segundo residuo.

Giro γ						
No.	Comienzo	Final	Secuencia	Residuo i+1		
				ϕ	ψ	ξ
1.	Phe14	Thr16	F D T	-83.6	72.1	-173.5

Tabla 3.11: Giro γ . Se visualiza el inicio y final del giro γ , la secuencia de residuos y los ángulos ϕ , ψ y ξ del segundo residuo.

3.2.2. Dominio *EF-hand*

Después de la minimización se obtuvo una variación en los bucles de los dominios *EF-hand*. Utilizando el programa LigPlot, se realizó un análisis de contactos de estos dominios observándose cambios. En el primer bucle, comprendido entre el Asp16 y el Glu26, se visualizó que ahora son cuatro los residuos que están en contacto con el calcio. La Asn17 pierde la interacción electrostática que lo unía al calcio 81, aunque sigue manteniendo una interacción no enlazante con éste, estos se pueden visualizar en la Figura 3.7. En el caso del segundo bucle, después de la minimización otro residuo se sumó a la interacción con el calcio, este residuo es el Asp58. En total serían seis residuos que han generado una interacción electrostática con el calcio 82.

En el caso del primer bucle son cinco las interacciones electrostáticas que se forman con respecto al calcio, generalmente una por residuo a excepción del Glu26 que generó dos interacciones electrostáticas con sus dos oxígenos, como se ve en la Tabla 3.12. Un aspecto importante de resaltar es el reordenamiento de los iones de calcio dentro de los bucles en la estructura de la polcalcina. La minimización permitió el relajamiento estructural

provocando que las distancias entre los oxígenos y los iones se acorten (no superan los 2.3 ángstrom), si se compara con la estructura obtenida por modelamiento.

En el segundo bucle se da la formación de seis interacciones electrostáticas que se forma entre el calcio 82 y el oxígeno de los residuos, como se ve en la Tabla 3.13. Las distancias entre los oxígenos y el calcio oscilan entre los 2.22 y 2.68 ángstrom. Estas distancias son un poco más grandes con respecto a las obtenidas en el primer bucle. A diferencia de la 2LVK el segundo bucle presenta una interacción electrostática más, esta diferencia se debe a que en la secuencia de Zea Mays presenta una Cys en la posición 56 dándole esta variación una mayor afinidad a iones divalentes.

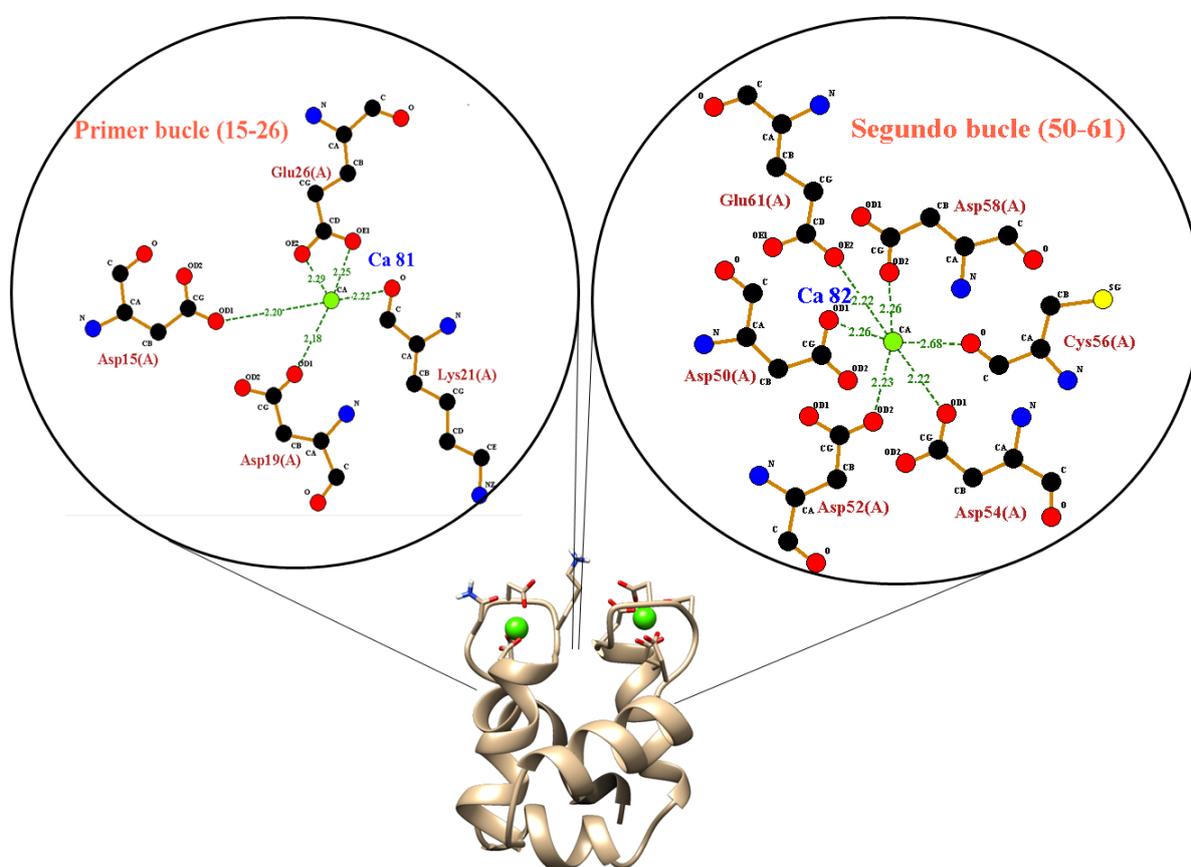


Figura 3.7: Estructura de la *Phl p 7* después de la minimización. Se muestran las diferentes interacciones electrostáticas del calcio con los residuos en cada bucle.

Interacción electrostática									
Átomo 1				Átomo 2				Dist. Å	
N°	N.	N.	N°	N°	N.	N.	N°		
ATM	ATM	Res.	Res.	ATM	ATM	Res.	Res.		
245	OD1	Asp	15	<->	1203	CA	CA	81	2.20
292	OD1	Asp	19	<->	1203	CA	CA	81	2.18
324	O	Lys	21	<->	1203	CA	CA	81	2.22
396	OE1	Glu	26	<->	1203	CA	CA	81	2.25
397	OE2	Glu	26	<->	1203	CA	CA	81	2.29

Tabla 3.12: Primer bucle. Descripción de las interacciones electrostáticas entre el calcio y la polcalcina. La tabla muestra el número del átomo, nombre del átomo, nombre del residuo y finalmente el número del residuo que interacciona con el calcio. En el primer bucle el calcio ocupa la posición número 81 en el archivo pdb. Finalmente se visualizan las distancias entre el calcio y el átomo del residuo que interacciona.

Interacción electrostática									
Átomo 1				Átomo 2				Dist. Å	
N°	N.	N.	N°	N°	N.	N.	N°		
ATM	ATM	Res.	Res.	ATM	ATM	Res.	Res.		
757	OD1	Asp	50	<->	1204	CA	CA	82	2.26
783	OD1	Asp	52	<->	1204	CA	CA	82	2.23
802	OD1	Asp	54	<->	1204	CA	CA	82	2.22
823	O	Cys	56	<->	1204	CA	CA	82	2.68
852	OD2	Asp	58	<->	1204	CA	CA	82	2.26
901	OE2	Glu	61	<->	1204	CA	CA	82	2.22

Tabla 3.13: Segundo bucle. Descripción de las interacciones electrostáticas entre el calcio y la polcalcina. La tabla muestra el número del átomo, nombre del átomo, nombre del residuo y finalmente el número del residuo que interacciona con el calcio. En el segundo bucle el calcio ocupa la posición número 82 en el archivo pdb. Finalmente se visualizan las distancias entre el calcio y el átomo del residuo que interacciona.

3.2.3. Estructura terciaria

La estructura terciaria sigue siendo la misma con una ligera diferencia a la estructura inicial (Figura 3.8). Con este proceso se buscó obtener una estructura optimizada que no genere fuerzas de repulsión altas y que permita realizar las dinámicas moleculares. Al hacer un RMSD con el programa UCSF Chimera, éste nos arroja un valor de 0.228 ángstrom comparando 80 pares de átomos, lo que indica que la diferencia entre la disposición de los átomos no es grande (Figura 3.8). La estructura sigue manteniendo su misma disposición tridimensional como se muestra en la Figura 3.9.

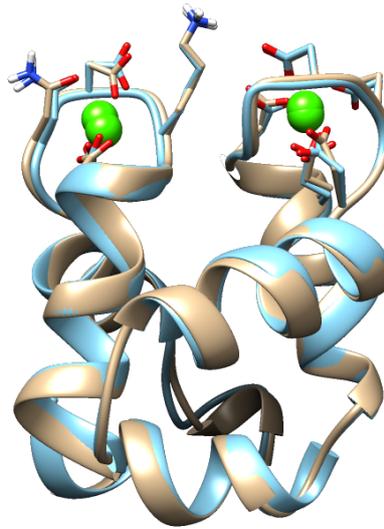


Figura 3.8: Estructura terciaria. Comparación mediante un alineamiento, de las estructuras terciarias inicial y la obtenida después de la minimización. En azul se aprecia la estructura inicial y en color caqui la obtenida después de la minimización.

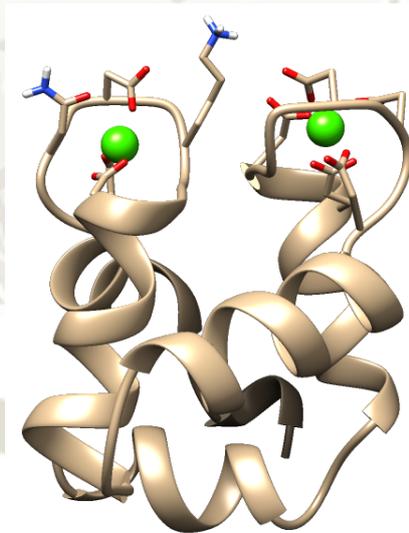


Figura 3.9: Estructura tridimensional de la *Phl p 7* después de la minimización.

3.2.4. Análisis de la estructura minimizada obtenida

Diagrama de Ramachandran

El servidor PDBsum arrojó los siguientes datos: de los 80 residuos, 61 de ellos se encontraban en las regiones favorecidas (A, B y L). Estos 61 residuos representan un 85.9% como se visualiza en el Apéndice A.6. Al comparar con la estructura inicial, se ve el aumento de residuos en las regiones favorecidas, este resultado es esperado ya que se

realizó una minimización para optimizar la estructura y reducir el número de valores $\phi-\psi$ no favorables.

En las regiones permitidas (a, b, l, p) están presentes 10 residuos lo que equivale a un 14.1 %. En las regiones permitidas generosamente y regiones no permitidas no encontramos ningún residuo. De los residuos que presentan los átomos involucrados en los contactos defectuosos encontramos a la Asp15, Asp19, Lys21, Glu26, Asp50, Asp52, Asp54, Asp58, Glu61 como se visualiza en la Tabla 3.14. Todos estos residuos tienen una interacción electrostática con el calcio, esta unión genera los ángulos $\phi-\psi$ no favorables. Como en el caso anterior, el servidor no analiza los ángulos generados por esta unión electrostática, por lo que se podría considerar que no es una estructura de buena calidad.

En la validación de estructuras, una estructura que obtenga el 100 % de residuos en las zonas favorecidas (perfecto) en los resultados no es el objetivo correcto y los errores atípicos no son necesariamente errores. Especialmente en estructuras pequeñas como es el caso de la *Phl p 7*, que adopta valores un poco alejados del óptimo, por lo que los valores atípicos se puede explicar y justificar en base a las interacciones con el calcio.

Contactos defectuosos									
Residuo 1				Residuo 2				Tipo de contacto	Dist. Å
Nº	Cadena	Tipo	ATM	Nº	Tipo	ATM			
15	A	Asp	OD1	->	81	CA	CA	S-H	2.2
19	A	Asp	OD1	->	81	CA	CA	S-H	2.2
21	A	Lys	O	->	81	CA	CA	M-H	2.2
26	A	Asp	OE1	->	81	CA	CA	S-H	2.2
50	A	Asp	OD1	->	82	CA	CA	S-H	2.3
52	A	Asp	OD2	->	82	CA	CA	S-H	2.2
54	A	Asp	OD1	->	82	CA	CA	S-H	2.2
58	A	Asp	OD2	->	82	CA	CA	S-H	2.3
61	A	Glu	OE2	->	82	CA	CA	S-H	2.2

Tabla 3.14: Contactos defectuosos. Este tipo de contactos se dieron entre un residuo y un metal que es el calcio. En la tabla se visualiza el tipo de residuo, el átomo interactuante, el número de residuo y la interacción que se da entre éste y el calcio. Solo se dieron dos tipos de contacto, el primero es entre la cadena lateral con los átomos que están en la sección HETATM del archivo pdb, en este caso sería los calcios (S-H) y el segundo contacto fue entre la cadena principal con el calcio (M-H).

ProSA-Web

ProSA-Web arrojó dos datos, la puntuación Z y el gráfico de puntuaciones de residuo. En valor obtenido del Z-score es -6.82, como se visualiza en Apéndice A.7. El gráfico

muestra las puntuaciones de todas las cadenas experimentales del servidor PDB. En este caso, nuestra estructura se visualiza como un punto negro dentro de la región RMN (azul oscuro) y la región de rayos-X (azul claro), eso quiere decir que nuestra estructura sigue estando dentro del rango de puntuaciones que se encuentran típicamente para proteínas nativas registradas.

La gráfica de puntuaciones de residuos muestra la calidad de la estructura representando las energías en función de la posición i de la secuencia de aminoácidos. En el Apéndice A.8 se visualiza que en su mayoría ningún dominio de la estructura presenta partes problemáticas. La gráfica muestra en color verde oscuro el análisis que hizo el servidor a 40 residuos, como puede observarse, existe una pequeña parte problemática o errónea ya que se visualiza algunos valores positivos. Finalmente la línea más delgada y de verde claro (que son 10 aminoácidos evaluados de la proteína), muestran valores negativos. En general, para este análisis la polcalcina muestra valores óptimos ya que en su mayoría las energías son negativas.

Con estos resultados positivos, el servidor ProSA-web verificó que la estructura obtenida después de la minimización era óptima. Este resultado confirma que la estructura que se utilizará para hacer los posteriores estudios teóricos es una estructura con valores representables en la naturaleza.

3.3. Dinámica molecular de la *Phl p 7*

3.3.1. Estructura secundaria

En este estudio se analizaron cinco temperaturas para evaluar los cambios conformacionales de la estructura de la *Phl p 7* las cuales fueron 17 °C, 37 °C, 57.9 °C, 77.3 °C y 97.3 °C. Las estructuras secundarias obtenidas después de 500 ns de DM para cada una de estas temperaturas mostraron diferentes características las cuales se pueden visualizar en la Figura 3.10. Para mayor comprensión de los cambios de las estructuras secundarias por efecto de las temperaturas, se colocó al centro de la figura anterior los resultados de la estructura obtenida después de la minimización. Se observa que a 17 °C, la *Phl p 7* presenta mayor conservación de las estructuras secundarias, conservando seis hélices α , una hoja β además de que los giros β aumentaron a 10 y perdió el giro γ inicial. A 37 °C se observa una pérdida de una hélice α pero sigue conservando la hoja β y el giro γ y los giros β aumentaron a 12. A 57.9 °C las estructuras secundarias conservadas fueron la hoja β y las hélices α , los giros β llegaron a seis y no se observaron giro γ . A 77.3 °C posee cinco hélices α , una hoja β , nueve giros β y ningún giro γ . Es importante resaltar que a

esta temperatura es donde se perdió más estructura secundaria. A 97.3 °C el número de hélices α alcanza cuatro en su estructura, una hoja β , 13 giros β y finalmente no posee ningún giro γ como se reporta en la Tabla 3.15.

Aunque el número de hélices α se conserva en las diferentes temperaturas, estas hélices α no conservan la secuencia de residuos y el número de estos, además tampoco conservan la posición del residuo donde empiezan y donde terminan. Se ve que mientras más pérdida de hélices α tenga la estructura, mayor será el número de giros β que se formen. A 17 °C es donde hay más conservación de la estructura secundaria y a 97.3 °C hay más pérdida de ésta.

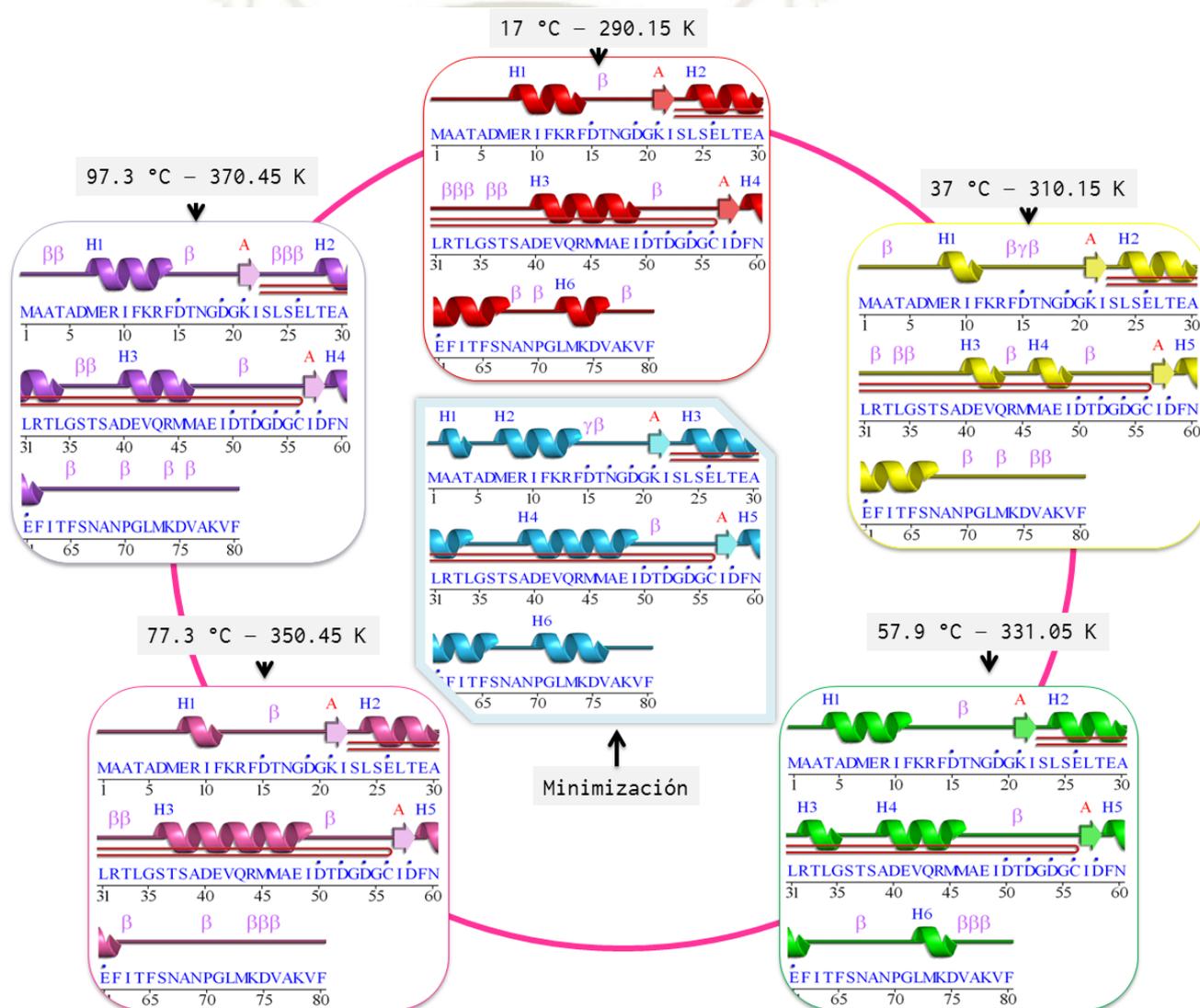


Figura 3.10: Estructura secundaria. En el centro esta ubicada la *Phl p 7* después de la minimización. El gráfico contiene cinco temperaturas con sus respectivas estructuras secundarias obtenidas por el servidor PDBsum. En rojo se presenta la temperatura a 17 °C, en amarillo a 37 °C, verde a 57.9 °C, magenta a 77.3 °C y finalmente en índigo a 97.3 °C.

Estructura secundaria				
T°	Helice α	Hoja β	Giro β	Giro γ
Minimización	6	1	2	1
17 °C	6	1	10	0
37 °C	5	1	12	1
57.9 °C	6	1	6	0
77.3 °C	5	1	9	0
97.3 °C	4	1	13	0

Tabla 3.15: Estructura secundaria. La tabla muestra el número hélices α , hoja β , giro β y giro γ de la *Phl p 7* después de ser sometidas a simulaciones de DM a diferentes temperaturas (17 °C, 37 °C, 57.9 °C, 77.3 °C Y 97.3°C). Como referencia también se muestran los datos obtenidos para la *Phl p 7* después de la minimización.

3.3.2. Dominio *Ef-hand*

Primer bucle

A lo largo de las diferentes temperaturas estudiadas se observa que siempre está mantenido los mismos cuatro residuos que generan una interacción electrostática con el calcio, el Asp15, Asp19, Lys21 y finalmente el Glu26. Aunque mantienen el mismo número de residuos, no conserva el mismo número de interacciones electrostáticas ya que éstas van variando dependiendo de la temperatura.

A 17 °C, como se observa en la Figura 3.11, se generan cinco interacciones electrostáticas entre los oxígenos de los residuos siendo el Glu26 el residuo que aportó dos oxígenos para que se generaran éstas. A 37 °C fueron seis interacciones electrostáticas las registradas, en este caso fue el Asp19 y el Glu26 los que aportaron dos oxígenos por cada uno para las interacciones. A 57.9 °C se generaron cinco interacciones electrostáticas y en este caso el Glu16 fue el que aportó dos oxígenos. A 77.3 °C se generaron cinco interacciones electrostáticas y en este caso fue el Glu26 el que aportó dos interacciones electrostáticas con el calcio. Finalmente a 97.3 °C fue la única temperatura donde se registraron siete interacciones electrostáticas siendo el Asp15, Asp19, y el Glu26 los que aportaron dos interacciones electrostáticas por cada uno. Las distancias en general de todo el bucle se reportan en el Apéndice A.1 y como se observa, los cuatro residuos que interactúan con el calcio son los que están más cerca de él y las distancias no superaron los 3 Å.

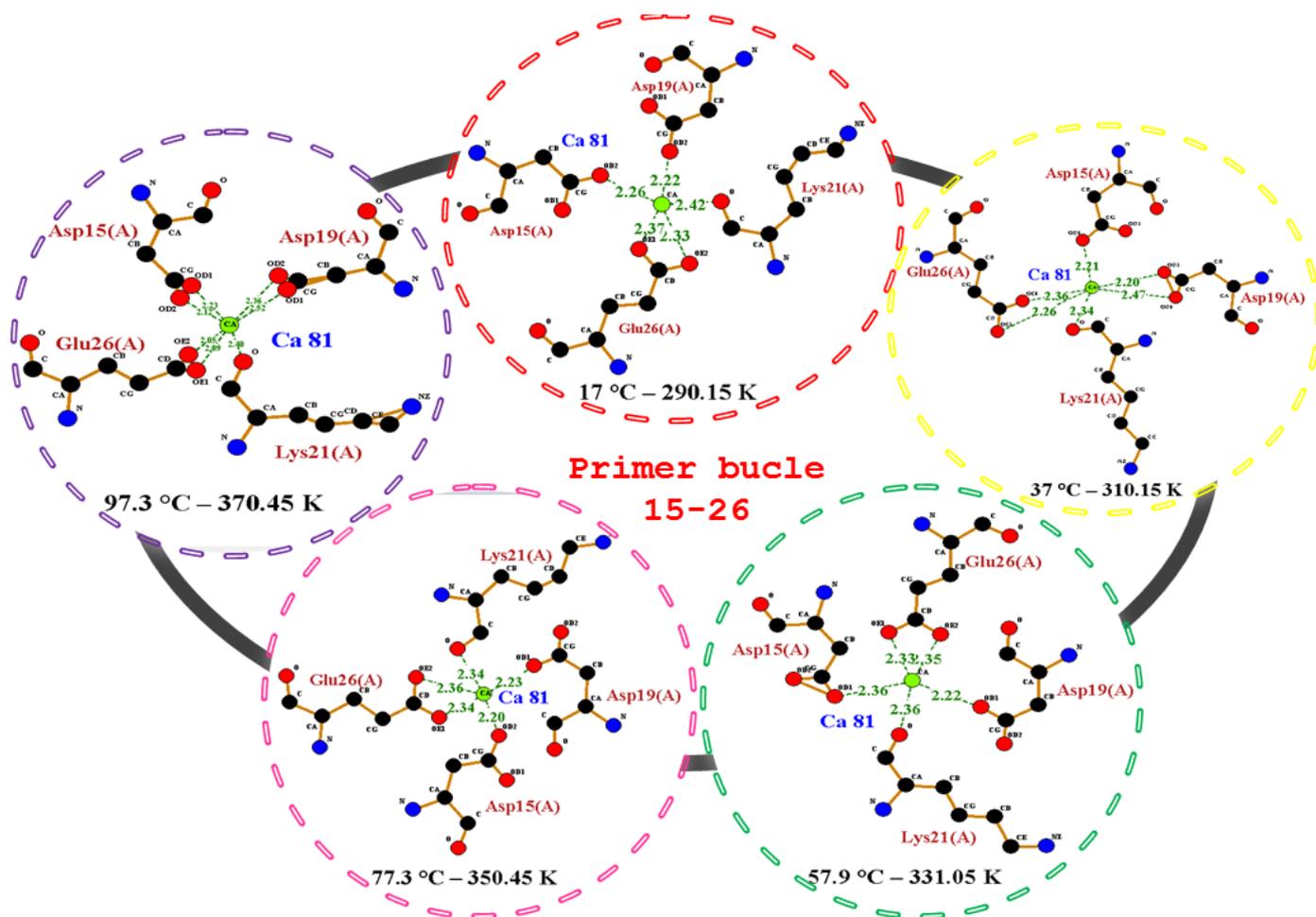


Figura 3.11: Primer bucle. Análisis estructural de las distancias residuo - calcio para cada una de las temperaturas usadas en este trabajo (17 °C, 37 °C, 57.9 °C, 77.3 °C Y 97.3 °C) para el primer bucle de la *Phl p 7*. Se puede observar que los residuos implicados en las interacciones electrostáticas se mantienen constantes siendo el Asp15, Asp19, Lys21 y el Glu26 los que generan estas interacciones. Las estructuras para cada temperatura están representadas en 2D donde en el centro se encuentra el calcio (círculo verde), los círculos rojos representan los oxígenos y las líneas verdes son las interacciones electrostáticas.

1. RMSD

Para analizar la estabilidad estructural de este primer bucle se realizó un estudio de los RMSD en esta parte del dominio a las diferentes temperaturas y fueron graficados usando QtGrace (Figura 3.12). Los resultados obtenidos muestran que los valores promedios del RMSD aumentan a medida que la temperatura asciende. Esto puede deberse al movimiento vibracional de los átomos en la estructura de la *Phl p 7*. Al analizar las desviación estándar (Tabla 3.16) se observa que la temperatura más estable se registró a 37 °C (± 0.017 nm) mientras que la mas inestable fue a 97.3 °C (± 0.030 nm).

En el primer bucle sometido a 37 °C y 97.3 °C se dio una mayor formación de

interacciones electrostáticas con el calcio, sin embargo esto no siempre es signo de estabilidad ya que la estructura a 97.3 °C fue donde más inestabilidad presentó en los promedios de RMSD (Tabla 3.16).

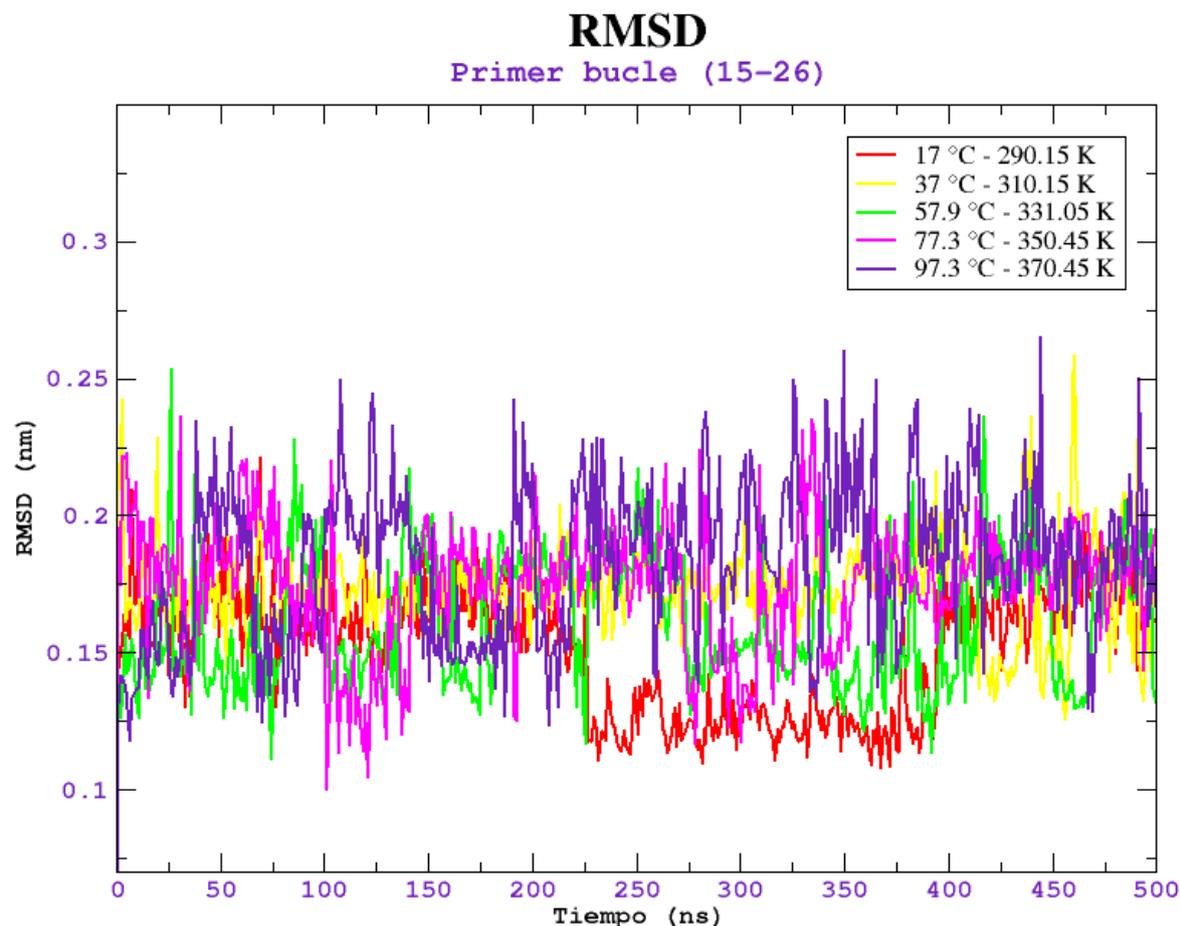


Figura 3.12: RMSD del primer bucle. En el eje de las abscisas está el tiempo de la DM a 500 ns, en las ordenadas el RMSD en nm. Cada temperatura está representada por un color, en rojo 17 °C, en amarillo 37 °C, verde 57.9 °C, magenta 77.3 °C y finalmente índigo 97.3°C.

RMSD (Primer bucle)	
Temperaturas	\bar{x}_{RMSD} (nm)
17 °C - 290.15 K	0.151 ± 0.023
37 °C - 310.15 K	0.172 ± 0.017
57.9 °C - 331.05 K	0.162 ± 0.024
77.3 °C - 350.45 K	0.175 ± 0.023
97.3 °C - 370.45 K	0.183 ± 0.030

Tabla 3.16: Valores del RMSD del primer bucle. Promedio obtenidos en las DM a 500 ns para cada temperatura, los valores son mostrados con su respectiva desviación estándar.

2. Radio de giro

Se evaluó el radio de giro para ver si el bucle se compactaba o se abría por efecto de las diferentes temperaturas estudiadas. Se sabe que en presencia de calcio las polcalcinas adoptan una conformación abierta, donde expone las superficies hidrofóbicas que están disponibles para unirse a péptidos o dominios de otras proteínas⁴⁹. Este mismo estudio menciona que cuando la polcalcina está libre de calcio, adopta una conformación cerrada. Para corroborar el tipo de conformación que adopta la *Phl p 7* se evaluó el radio de giro.

Los resultados muestran que en el primer bucle existe una progresión ascendente en el promedio de radio de giro en relación con el aumento de la temperatura. Sin embargo existe una excepción con la estructura sometida a 37 °C como se visualiza en la Tabla 3.17 y en la Figura 3.13, ya que este bucle presentó los picos y promedio más altos. A esta última temperatura el promedio de distancias entre los residuos, que generaron una interacción electrostática, y el calcio fue de 0.232 nm con un radio de giro promedio de 0.624 ± 0.011 nm. A 97.3 °C la distancia fue de 0.233 nm y un radio de giro de 0.618 ± 0.016 nm. Una observación interesante se encontró al conectar los datos de distancia entre el calcio y los residuos (Apéndice A.1), con los resultados obtenidos del radio de giro. Se pudo observar que cuando el calcio se aleja del bucle existe un aumento en el promedio de radio de giro lo que genera una descompactación ligera del bucle (estructura abierta). Lo que sugiere que para este primer bucle la forma cerrada o abierta esta correlacionada a la distancia calcio-bucle.

Radio de giro

Primer bucle (15-26)

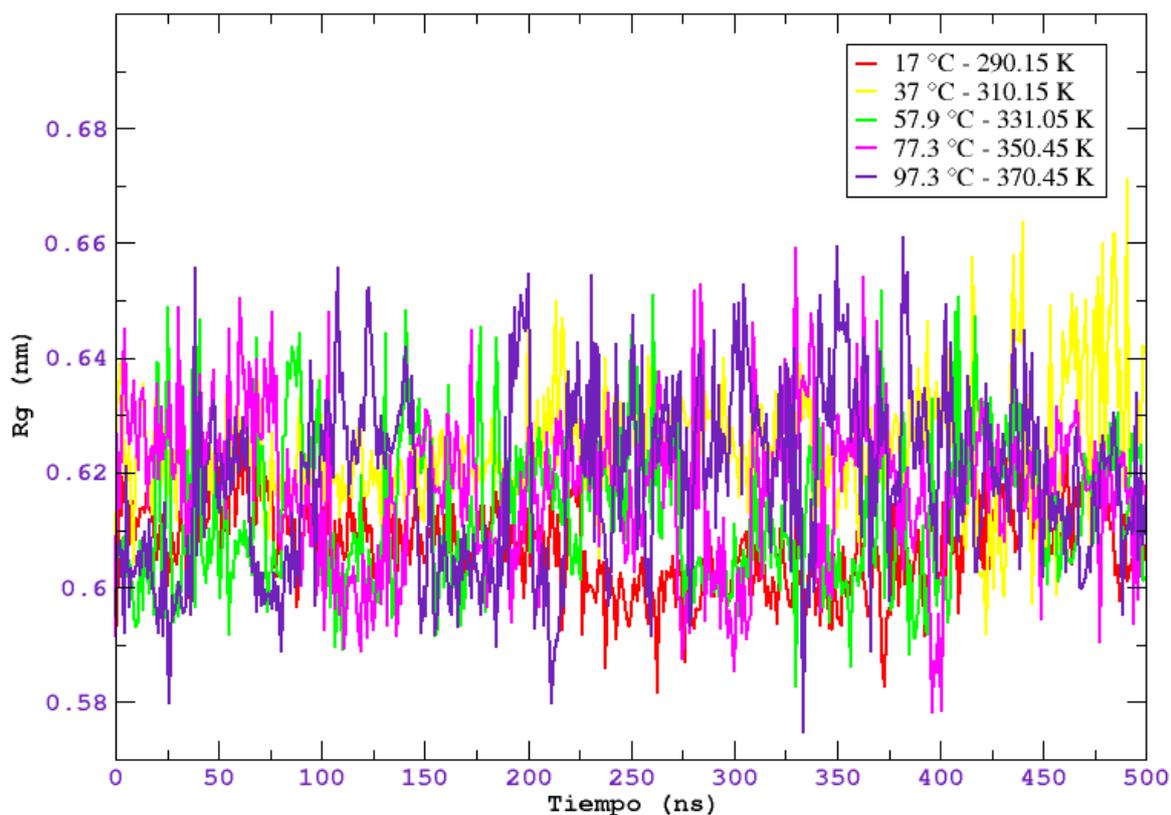


Figura 3.13: Radio de giro del primer bucle. En el eje de las abscisas está el tiempo de la DM a 500 ns, en el eje de las ordenadas el Rg en nm. Cada temperatura esta simbolizada por un color; en rojo, 17 °C; en amarillo, 37 °C; verde, 57.9 °; magenta, 77.3 °C y finalmente índigo, 97.3°C.

Radio de giro (Primer bucle)	
Temperaturas	\bar{x}_{Rg} (nm)
17 °C - 290.15 K	0.607 ± 0.008
37 °C - 310.15 K	0.624 ± 0.011
57.9 °C - 331.05 K	0.613 ± 0.013
77.3 °C - 350.45 K	0.617 ± 0.013
97.3 °C - 370.45 K	0.618 ± 0.016

Tabla 3.17: Valores de radio de giro del primer bucle. Promedio obtenidos en las DM a 500 ns para cada temperatura, los valores son mostrados con su respectiva desviación estándar.

Segundo bucle

En las diferentes temperaturas estudiadas se observa que este bucle mantiene los mismo seis residuos que generan una interacción electrostática con el calcio, el Asp50, Asp52, Asp54, Cys56, Asp58 y finalmente, el Glu61. Aunque mantienen el mismo número de residuos, no conserva el mismo número de interacciones electrostáticas ya que estas interacciones van variando dependiendo de la temperatura. A 17 °C, 37 °C y 97.3 °C fueron siete interacciones electrostáticas las registradas, siendo el Glu61 el que aportó dos oxígenos por cada una de las interacciones (Figura 3.14). A 57.9 °C como a 77.3 °C, se generaron seis interacciones electrostáticas, una por cada residuo. Las distancias de los 12 residuos que conforman al segundo bucle se reportan en el Apéndice A.2 y como se observa, los seis residuos que interactúan con el calcio son los que están más cerca de él y las distancias no superaron los 2.5 Å.



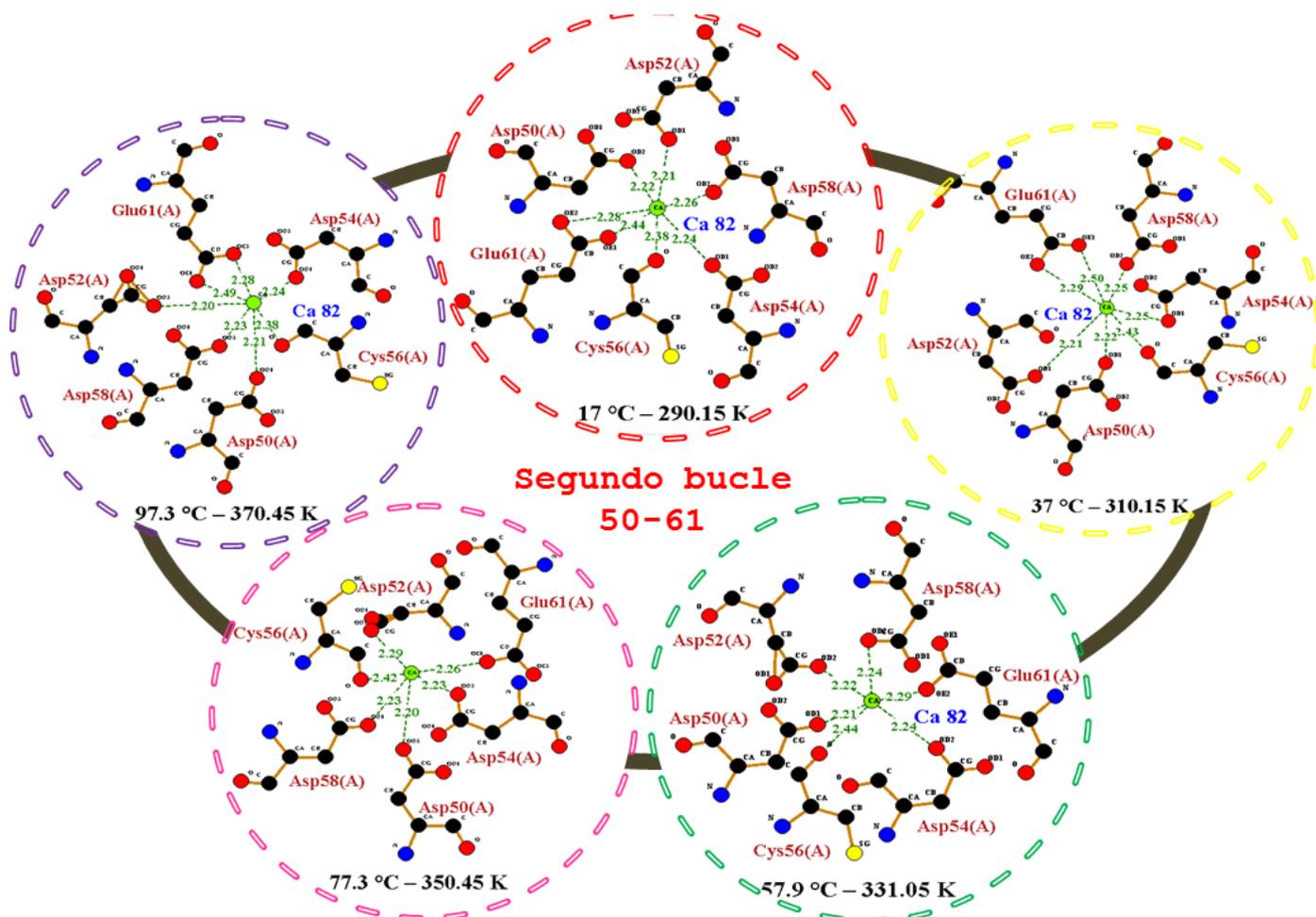


Figura 3.14: Segundo bucle. Análisis estructural de las distancias residuo - calcio para cada una de las temperaturas usadas en este trabajo (17 °C, 37 °C, 57.9 °C, 77.3 °C Y 97.3 °C). Se puede observar que los residuos implicados en las interacciones electrostáticas se mantienen constantes siendo el Asp50, Asp52, Asp54, Cys56, Asp58 y el Glu61 los que generan estas interacciones. Las estructuras para cada temperatura están representadas en 2D donde en el centro se encuentra el calcio (círculo verde), los círculos rojos representan los oxígenos y las líneas verdes son las interacciones electrostáticas.

1. RMSD

Para este se evaluaron también los RMSD para analizar la estabilidad estructural. Los resultados obtenidos muestran que los valores promedios aumentaron a medida que la temperatura se elevó. Al analizar la desviación estándar (Tabla 3.18) se observó que la temperatura más estable se registró a 57.9 °C (± 0.014 nm), mientras que la más inestable fue a 77.3 °C (± 0.026 nm). Los picos más altos se registraron a las temperaturas de 77.3 °C Y 97.3 °C, como se visualiza en la Figura 3.15, (colores indigo y magenta , correspondientemente).

Aunque a 77.3 °C y a 57.9 °C se dio el mismo número de interacciones electrostáticas, fueron estas estructuras donde se presentó mayor y menor inestabilidad. En

conclusión, el número interacciones electrostáticas no es un factor que determine estabilidad, para esta polcalcina.

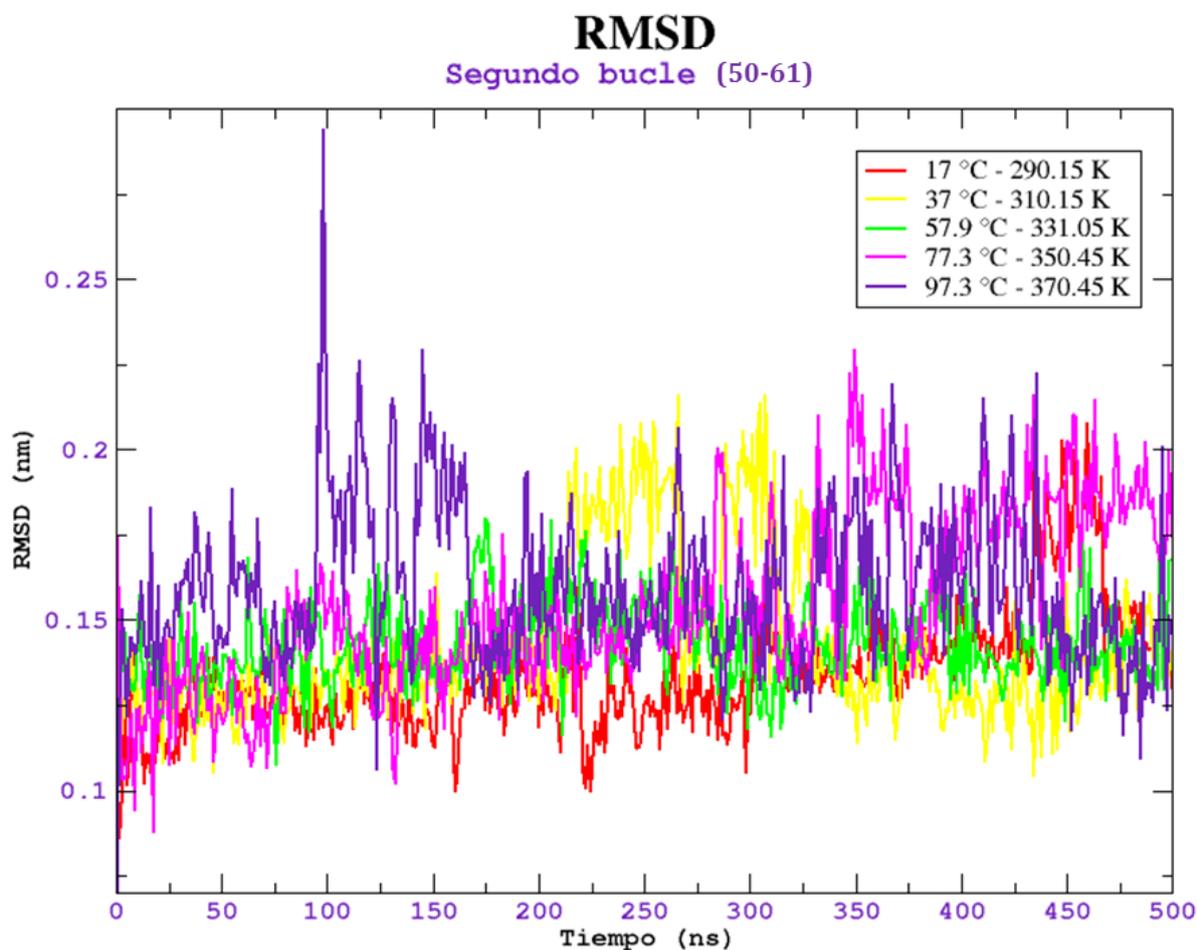


Figura 3.15: RMSD del segundo bucle. En el eje de las abscisas se muestra el tiempo de la DM a 500 ns, y en las ordenadas, el RMSD en nm. Cada temperatura esta representada por un color; en rojo, 17 °C; en amarillo, 37 °C; verde, 57.9 °C; magenta, 77.3 °C y finalmente índigo, 97.3 °C.

RMSD (Segundo bucle)	
Temperaturas	\bar{x}_{RMSD} (nm)
17 °C - 290.15 K	0.133 ± 0.018
37 °C - 310.15 K	0.142 ± 0.024
57.9 °C - 331.05 K	0.142 ± 0.014
77.3 °C - 350.45 K	0.154 ± 0.026
97.3 °C - 370.45 K	0.159 ± 0.024

Tabla 3.18: Valores del RMSD del segundo bucle. Promedio obtenidos en las DM a 500 ns para cada temperatura, los valores son mostrados con su respectiva desviación estándar.

2. Radio de giro

En el segundo bucle los resultados muestran que no hay una progresión ascendente en el promedio de radio de giro en relación con el aumento de la temperatura (Figura 3.16). Los picos más sobresalientes son amarillos que corresponden a la temperatura de 37 °C, igualmente ésta tiene el promedio mas alto 0.605 ± 0.012 nm (Tabla 3.19). Desde los 300 ns esta estructura comienza a tener picos ascendentes lo que parece indicar que se está dando una ligera descompactación. Por el contrario, a 17 °C fue la estructura más estable con una desviación de ± 0.009 nm. El promedio de distancias entre los residuos que generaron una interacción electrostática y el calcio fueron los siguientes: a 17 °C (0.228 nm) la cual fue la menor distancia registrada y la mayor fue a 57.9 °C (0.230 nm). En las demás temperaturas se registró un valor de 0.229 nm. AL hacer una comparación de estos datos de distancias entre el calcio y los residuos (Apéndice A.2) con los resultados obtenidos de radio de giro se pudo observar que para este segundo bucle, a 17 °C es donde se presenta el menor radio de giro y las distancias con el calcio son las menores. A 57.9 °C es donde se registró la mayor distancia, sin embargo el bucle presentó una mayor estabilidad sin cambios bruscos en su compactación. Lo que sugiere que para el segundo bucle la forma cerrada o abierta tiene una leve correlación a la distancia calcio-bucle. Estos resultados no corroboran lo observado por Michael T Henzl et al. en el cual mencionan que la *Phl p 7* en ausencia de iones divalentes, ambas *EF-hand* residen en la conformación cerrada. Posiblemente se de porque el comportamiento de *Phl p 7* de *Zea Mays* se asemeja más a la calmodulina donde los ángulos interhelical para los sitios 1 y 2 — 124° y 143° en la apoproteína se contraen a 107° y 93°, respectivamente, con la unión de calcio⁵¹.

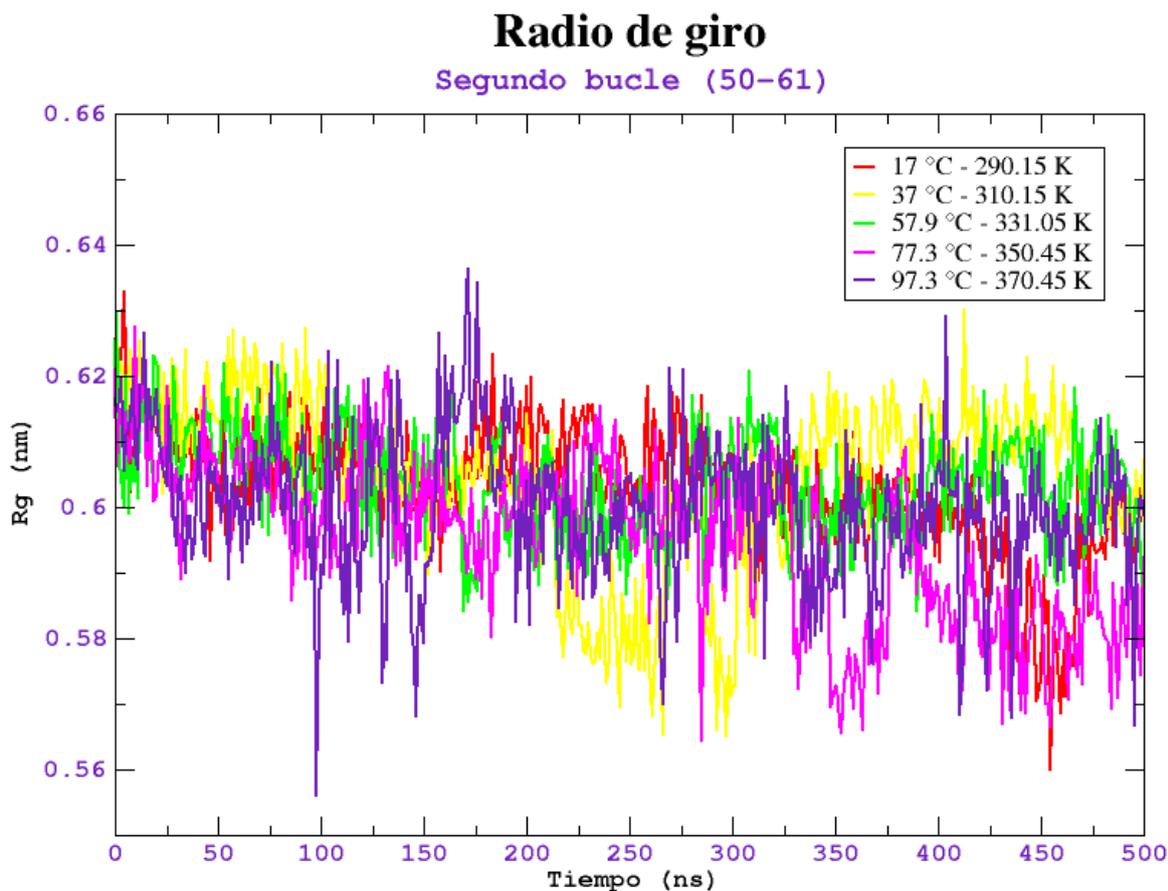


Figura 3.16: Radio de giro del segundo bucle En el eje de las abscisas se muestra el tiempo de la DM a 500 ns y en el eje de las ordenadas el Rg en nm. Cada temperatura esta representada por un color, en rojo 17 °C, en amarillo 37 °C, verde 57.9 °C, magenta 77.3 °C y finalmente índigo 97.3 °C.

Radio de giro (Segundo bucle)	
Temperaturas	\bar{x}_{Rg} (nm)
17 °C - 290.15 K	0.603 ± 0.009
37 °C - 310.15 K	0.605 ± 0.012
57.9 °C - 331.05 K	0.604 ± 0.008
77.3 °C - 350.45 K	0.595 ± 0.012
97.3 °C - 370.45 K	0.600 ± 0.011

Tabla 3.19: Valores de radio de giro del primer bucle. Promedio obtenido en las DM a 500 ns para DM de 500 ns para cada temperatura, los valores son mostrados con su respectiva desviación estándar.

3.3.3. Estructura terciaria

Después de efectuar las DM a diferentes temperaturas, se puede visualizar en la Figura 3.17 como la *Phl p 7* va perdiendo su estructura terciaria inicial. Es un resultado esperado, ya que al someter una proteína a diferentes temperaturas se genera una desnaturalización de ésta. También se observa una mayor pérdida de la estructura terciaria a 77.3 °C a pesar de que esta no sea la temperatura más elevada y se ve mayor estabilidad a 17 °C. Otro aspecto resaltante es que en las diferentes estructuras terciarias se observa que los dominios *Ef-hand* son las que más estabilidad presentan, ya que se conservan después de someterlas a diferentes temperaturas.

Al realizar un RMSD con el programa UCSF Chimera para comparar todas las estructuras finales con la estructura inicial de la minimización no obtenemos valores secuenciales, por eso es necesario tomar en cuenta el número de pares átomos comparados. El programa toma 80 pares de átomos que tiene la estructura inicial de la minimización y estos se comparan con las otras estructuras para ver si siguen conservando las mismas posiciones de esos pares de átomos. Las coincidencias entre estos 80 pares de átomos en las diferentes estructuras obtenidas van disminuyendo con el aumento de la temperatura (Tabla 3.20). A 77.3 °C es donde menos conserva los mismo pares de átomos y nos da el RMSD más elevado, corroborando que esta fue la temperatura que desnaturalizó mas a la *Phl p 7*. Por otra parte a 17 °C es donde está más estable la proteína. Estos datos verifican que la temperatura tiene un efecto estructural en la *Phl p 7*.

Temperaturas	RMSD (ángstrom)
17 °C - 290.15 K	Entre 49 pares de átomos, 1.06
37 °C - 310.15 K	Entre 48 pares de átomos, 1.02
57.9 °C - 331.05 K	Entre 42 pares de átomos, 1.09
77.3 °C - 350.45 K	Entre 34 pares de átomos, 1.16
97.3 °C - 370.45 K	Entre 40 pares de átomos, 1.06

Tabla 3.20: RMSD entre la estructura inicial y la final después de someter la proteína a diferentes temperaturas. Estos datos fueron obtenidos usando el software UCSF Chimera.

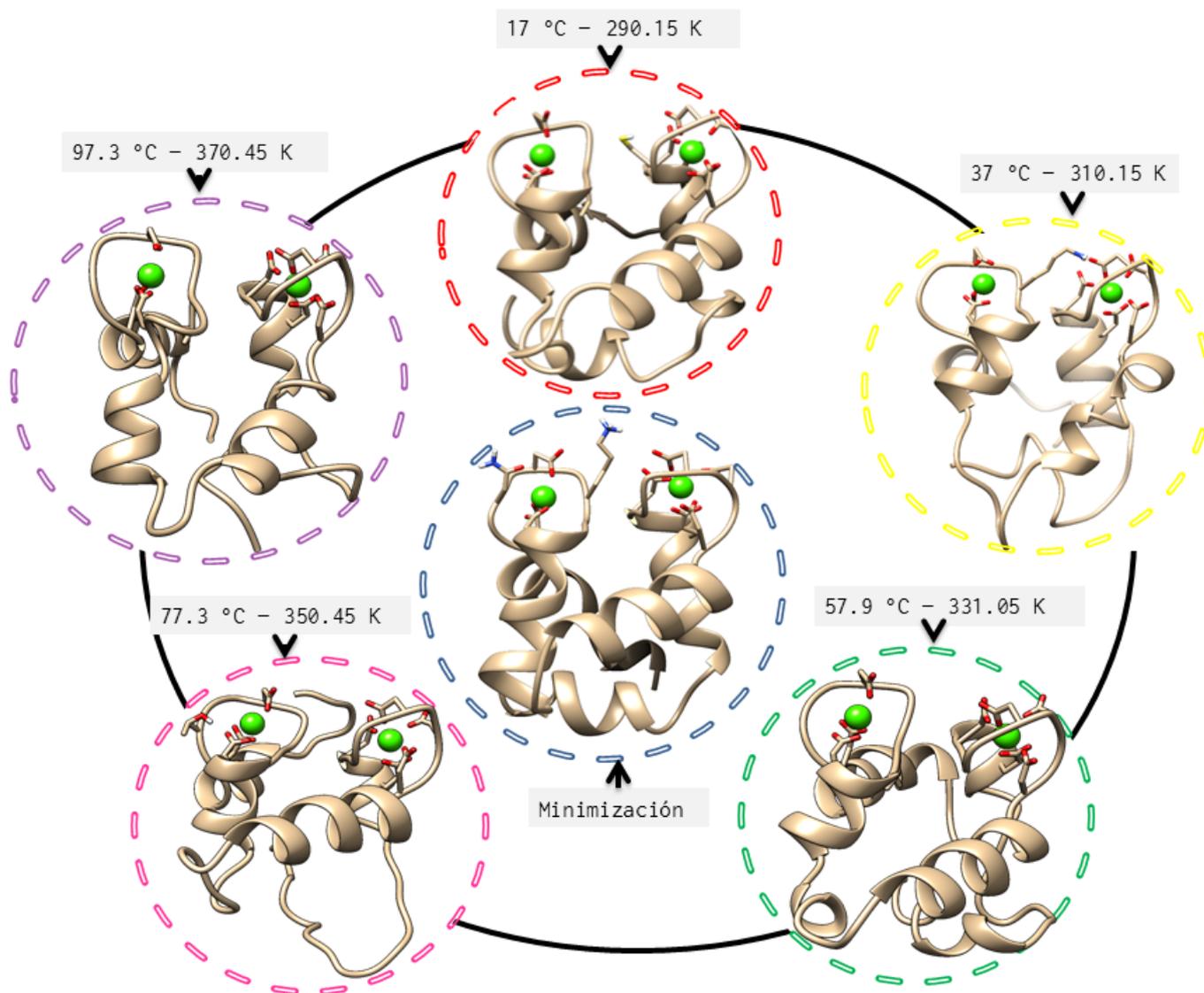


Figura 3.17: Estructura terciaria de la polcalcina *Phl p 7*. En el centro está ubicada la estructura después de la minimización como referencia. El gráfico contiene las cinco temperaturas con sus respectivas estructuras terciarias. En el círculo rojo se presenta la estructura después de someterla a 17 °C en amarillo a 37 °C, verde a 57.9 °C, magenta a 77.3 °C y finalmente índigo a 97.3 °C.

Para analizar la estabilidad estructural de toda la *Phl p 7* se utilizó algunos indicadores de equilibrio estructural como el RMSF, RMSD, radio de giro y enlaces de hidrógeno.

1. RMSF

Las fluctuaciones cuadráticas media de la proteína evalúa el movimiento que hay de los aminoácidos, es decir, las variaciones que sufren al aplicarles las respectivas temperaturas durante las simulaciones de DM. Al analizar este diagrama podemos conocer que residuos presentan menos vibración lo que indica estabilidad de éstos. En este caso es importante visualizar los residuos que conforman el bucle en donde

se une el calcio ya que se ve que es donde presenta más estabilidad, después de hacer una comparación de las cinco diferentes temperaturas (Figura 3.18). La vibración de los residuos va aumentando en proporción a la temperatura, las partes más inestables son generalmente los extremos de la *Phl p 7* y las parte más estable es la zona del dominio *EF-hand*, en específico, el bucle.

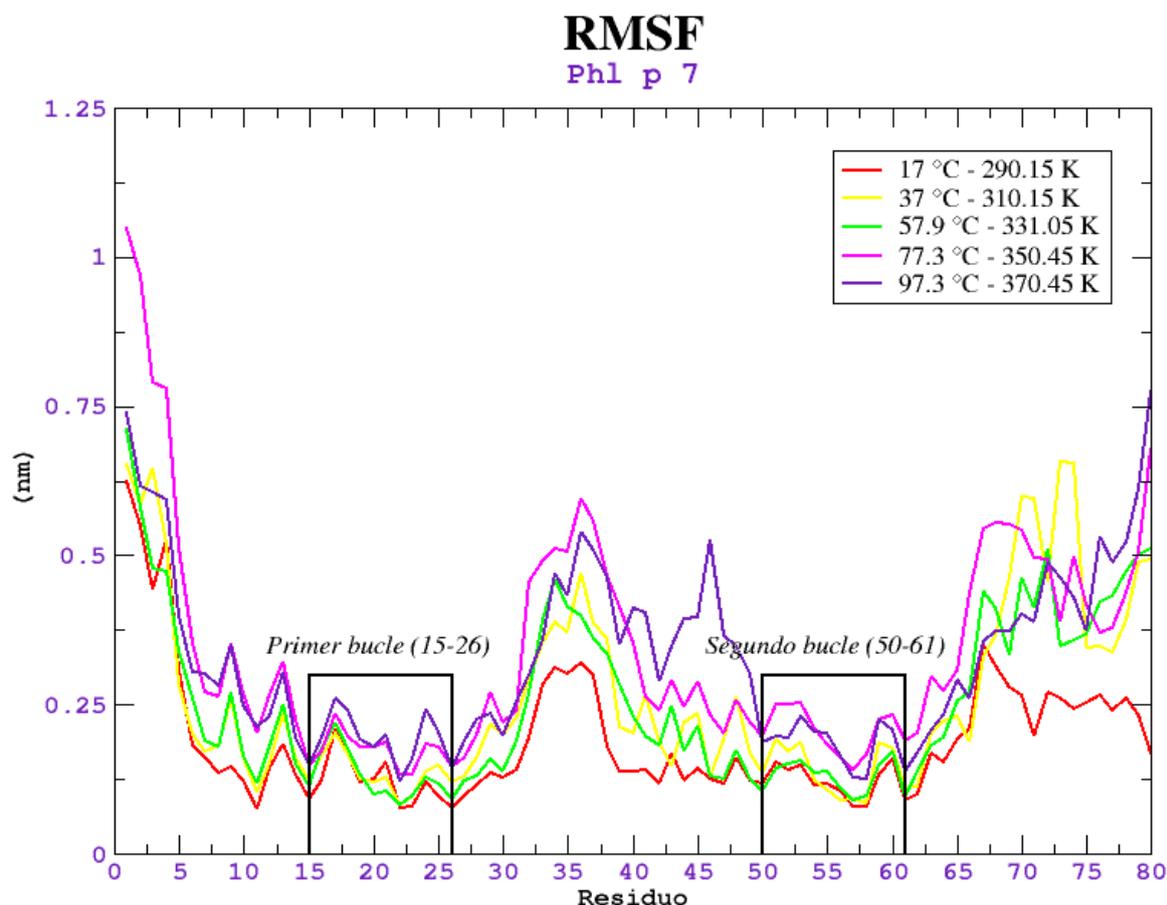


Figura 3.18: RMSF. En el eje de las abscisas está el número de residuo en el eje de las ordenadas la distancia promedio de la vibración en nm. Cada temperatura esta representada por un color en rojo es a 17 °C, en amarillo es a 37 °C, verde es a 57.9 °C, magenta es a 77.3 °C y finalmente índigo es 97.3 °C.

2. RMSD

Calculando el RMSD total de la polcalcina, se analizaron los valores obtenidos y fueron analizados con QtGrace obteniendo un promedio de estos valores. A mayor temperatura hubo mayor movimiento de los átomos, lo que podría traducirse a una mayor desnaturalización aunque no exista una diferencia entre las diferentes estructuras. Ésto nos da indicios de la estabilidad térmica de la *Phl p 7*.

A 17 °C hay gran estabilidad a lo largo de la DM sin embargo a los 450 ns se observó un pico el cual mostró una pequeña desestabilidad en la estructura (Figura 3.19). A 37 °C se ve una gran estabilidad a lo largo de los 500 ns sin picos pronunciados. A 57.9 °C se observa dos picos altos a 250 ns hasta los 330 ns y a 440 ns. A 77.3 °C en general a lo largo de toda la dinámica es la que presenta mayor desestabilización especialmente en los últimos 100 ns. Finalmente a 97.3 °C son los picos que más sobresalen pero a la vez presenta estabilidad a lo largo de la DM. Al comparar los RMSD promedio se ve un secuencia ascendente en relación con el aumento de la temperatura, como se ve en la Tabla 3.21. Se confirma que al aumentar la temperatura va perdiendo estabilidad posiblemente hasta llegar a una desnaturalización de la proteína.

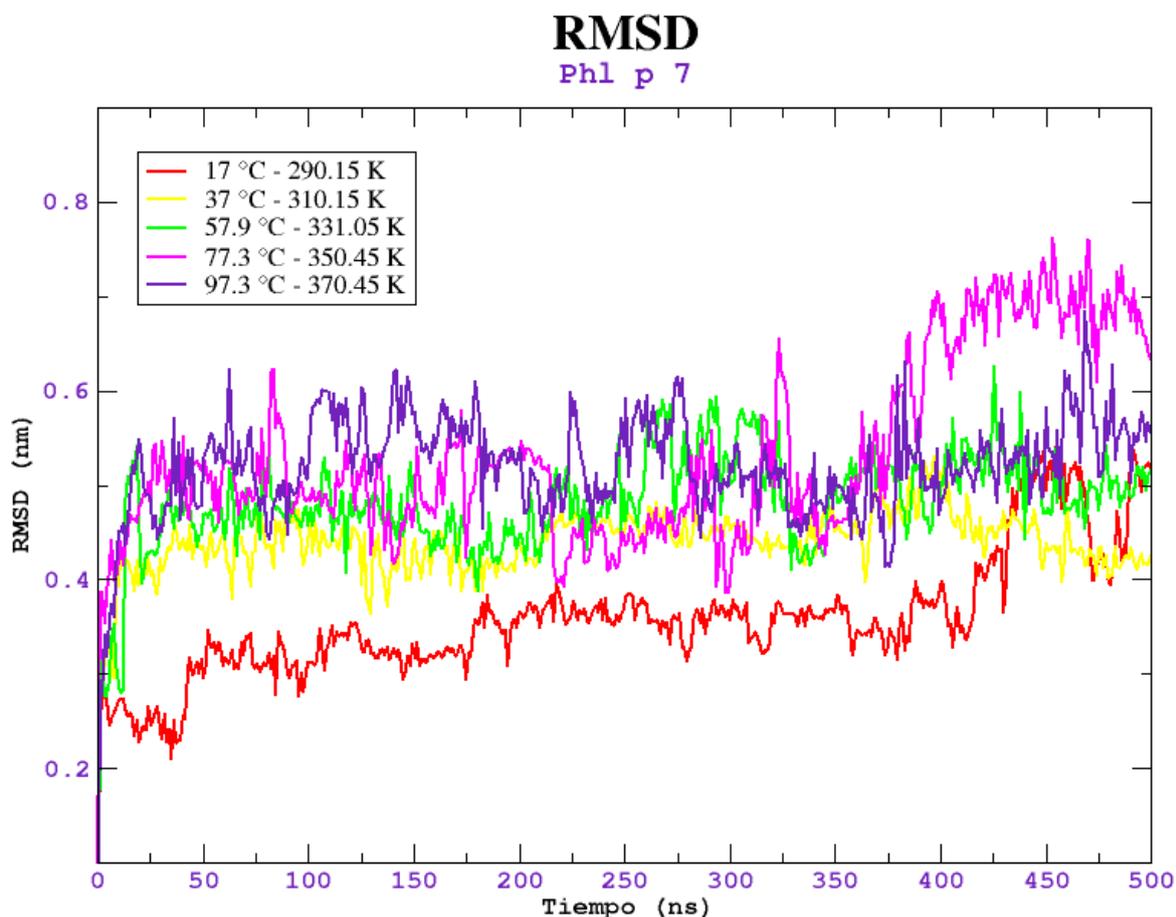


Figura 3.19: RMSD de la Phl p 7. En el eje de las abscisas está el tiempo de la DM a 500 ns, en el eje de las ordenadas el RMSD en nm. Cada temperatura esta representada por un color, en rojo es a 17 °C, en amarillo es a 37 °C, verde es a 57.9 °C, magenta es a 77.3 °C y finalmente índigo es 97.3 °C.

RMSD	
Temperaturas	\bar{x}_{RMSD} (nm)
17 °C - 290.15 K	0.36 ± 0.04
37 °C - 310.15 K	0.43 ± 0.06
57.9 °C - 331.05 K	0.48 ± 0.09
77.3 °C - 350.45 K	0.53 ± 0.06
97.3 °C - 370.45 K	0.52 ± 0.07

Tabla 3.21: Valores del RMSD de la *Phl p 7*. Promedio del RMSD para cada temperatura de la DM a 500 ns con su respectiva desviación estándar.

3. Radio de giro

El radio de giro nos indica la compactación de una proteína además de visualizar la desnaturalización de una proteína. Si es que con el tiempo el valor del radio de giro tiende a ascender es signo de que se está desnaturalizando y si los picos descienden significa que la estructura se está compactando. En el diagrama (Figura 3.20) a la temperatura de 77.3 °C al final de la DM hay picos ascendentes que significa que la *Phl p 7* se está descompactando, lo mismo se puede apreciar a 97.3 °C. En las temperaturas menores no se ve esos pronunciados picos pero tampoco se visualiza estabilidad lo que nos indica que optó una ligera conformación abierta.

Se evaluó el promedio y se visualiza un aumento del radio de giro proporcional al aumento de la temperatura, como se muestra en la Tabla 3.22. Corroborando con el RMSD, se puede ver que hay mayor movimientos de los átomos, una pérdida de la estructura original terciaria sobre todo a 77.3 °C.

Radio de giro

Phl p 7

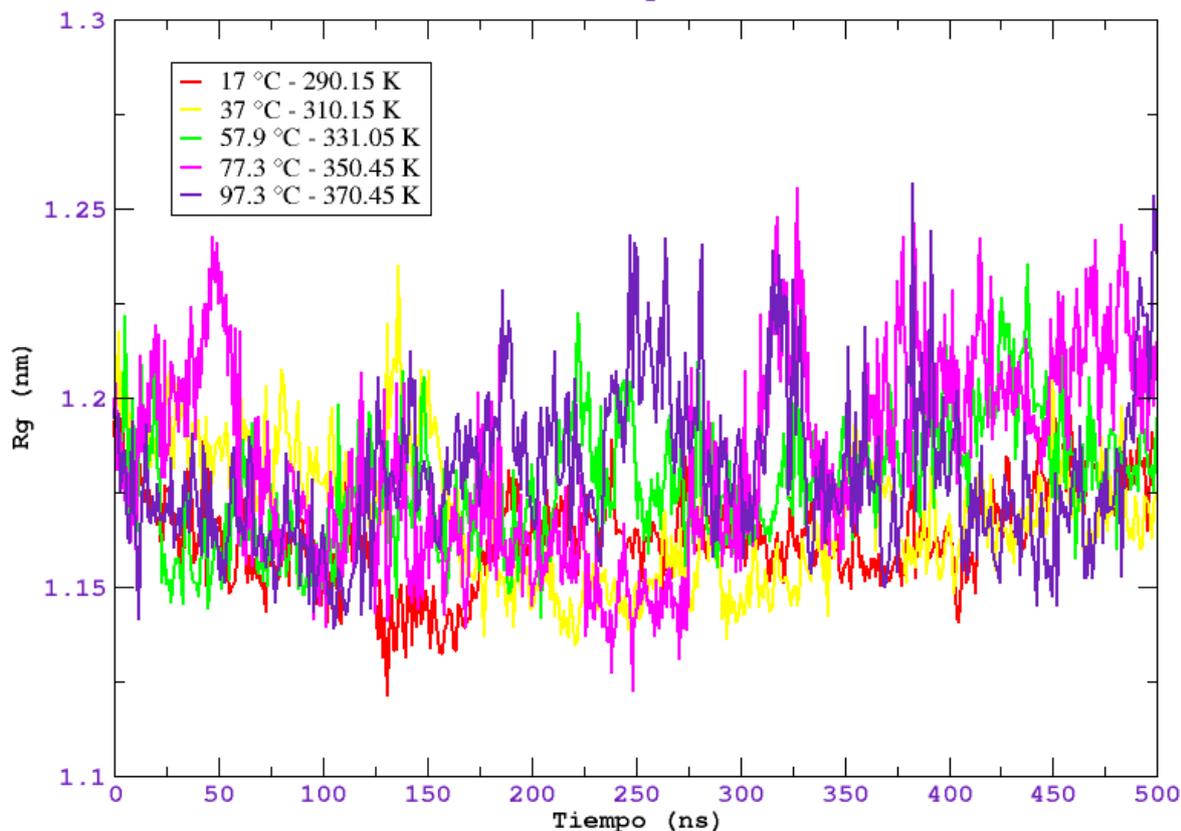


Figura 3.20: Radio de giro de la *Phl p 7*. En el eje de las abscisas está el tiempo de la DM a 500 ns, en el eje de las ordenadas el R_g en nm. Cada temperatura esta representada por un color; en rojo, 17 °C; en amarillo, 37 °C; verde, 57.9 °C; magenta, 77.3 °C y finalmente índigo, 97.3°C.

Radio de giro	
Temperaturas	\bar{x}_{R_g} (nm)
17° C - 290.15 K	1.16 ± 0.01
37 °C - 310.15 K	1.17 ± 0.02
57.9 °C - 331.05 K	1.18 ± 0.02
77.3 °C - 350.45 K	1.18 ± 0.03
97.3 °C - 370.45 K	1.18 ± 0.02

Tabla 3.22: Valores de radio de giro de la *Phl p 7* Promedio obtenidos las DM a 500 ns para cada temperatura, los valores son mostrados con su respectiva desviación estándar.

4. Enlaces de hidrógeno

El número de enlaces de hidrógeno se estima entre la proteína con las diferentes partículas del solvente o con ella misma, en este caso solo se evaluó los enlaces de hidrógeno generados consigo misma. Como se visualiza en la Figura 3.21 no existe mucha diferencia entre los números de enlaces generados a lo largo de la DM, pero resaltan dos picos entre todos el índigo que cae hasta 40 enlaces de hidrógeno que corresponde a la temperatura de 97.3 °C. Los picos magenta son los que también resaltan los cuales corresponden a la temperatura de 77.3 °C. Esto diferentes picos nos da indicios de que hay una creación y rompimiento de enlaces de hidrógeno significativa.

Al observar los promedios obtenidos (Tabla 3.23), el número de enlaces de hidrógeno oscila entre 57.41 ± 4.67 hasta 55.16 ± 4.17 . Se sabe que los enlaces de hidrógeno son signo de estabilidad en las proteínas y al perder algunos de éstos nos da indicios de que se perdió estructura terciaria. Hay una pérdida de éstos por la temperatura aunque no es muy grande ya que solo hay una diferencia de dos enlaces de hidrógeno.

Enlaces de hidrógeno

Phl p 7

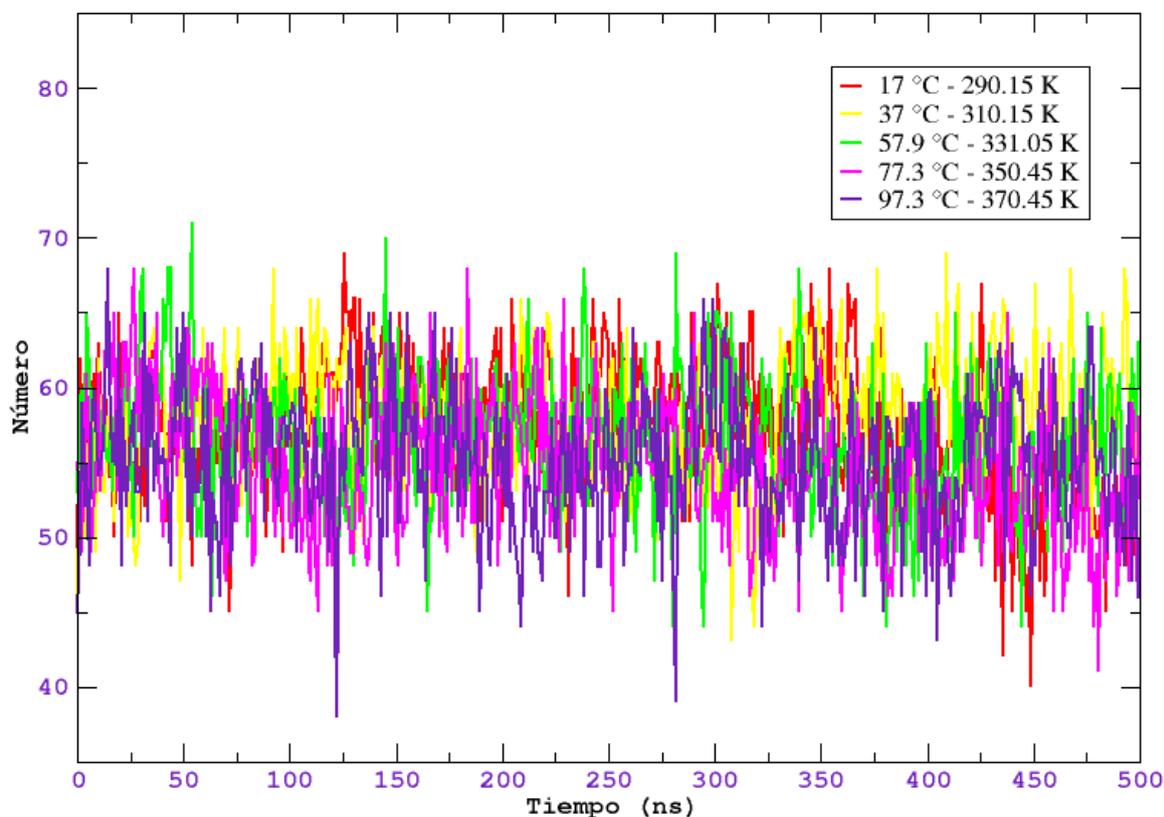


Figura 3.21: Enlaces de hidrógeno de la *Phl p 7*. En el eje de las abscisas está el tiempo de la DM a 500 ns, en el eje de las ordenadas el número de enlaces de hidrógeno. Cada temperatura esta representada por un color; en rojo, 17 °C; en amarillo, 37 °C; verde, 57.9 °C; magenta, 77.3 °C y finalmente índigo, 97.3°C.

Enlaces de hidrógeno	
Temperaturas	\bar{x}_H
17 °C - 290.15 K	57.42 ± 4.67
37 °C - 310.15 K	57.89 ± 4.41
57.9 °C - 331.05 K	56.60 ± 4.54
77.3 °C - 350.45 K	54.68 ± 4.67
97.3 °C - 370.45 K	55.15 ± 4.72

Tabla 3.23: Valores de número de enlaces de hidrógeno de la *Phl p 7*. Promedio obtenidos en las DM a 500 ns para cada temperatura, los valores son mostrados con su respectiva desviación estándar.

3.3.4. Epítupos

Se analizó los posibles sitios de unión de la *Phl p 7* con la IgE, los resultados se muestran en la Figura 3.22. ElliPro predijo los epítupos de la *Phl p 7* después de someterla a dife-

rentes temperaturas. En la estructura inicial, después de la minimización, presenta cinco epítomos lineales en la que cada epítomo está ponderado según su respectiva puntuación.

El epítomo con mayor puntuación está resaltado con color amarillo, el segundo de color verde, el tercer de color celeste, el cuarto está resaltado con magenta, el quinto está resaltado con plomo y finalmente el sexto puesto está resaltado de rojo. A 17 °C es el único caso donde presenta seis epítomos lineales. Se visualiza que los epítomos varían en su secuencia de residuos y en algunos casos la cantidad de epítomos se reduce como en las temperaturas de 57.9 °C y 77.3 °C donde solo presenta cuatro epítomos. Estos datos obtenidos nos brinda los posibles sitios de unión de la IgE a la *Phl p 7*.



Figura 3.22: Epítomos. Se presentan los 80 residuos que integran la *Phl p 7* y resaltado en diferentes colores los epítomos lineales ponderados según su respectiva puntuación en las diferentes estructuras obtenidas de la *Phl p 7* después de someterlas a diferentes temperaturas.

3.4. Acoplamiento molecular

3.4.1. Inmunoglobulina E

Se obtuvo una región Fab de una IgE⁹⁹ que consta de una cadena pesada nombrada como cadena C y la cadena ligera nombrada como cadena B como se visualiza en la Figura 3.23. Para este estudio solo se necesitó esta parte de la IgE para poder estudiar la interacción con la *Phl p 7* ya que el Fab consta con la región variable donde se une con el antígeno.

La cadena ligera consta de 217 residuos y la región pesada con 230 residuos, el CDR integra dos fragmentos de las dos cadenas. En la cadena ligera va desde el residuo 99 al 101 y en el caso de la cadena pesada es desde el residuo 99 al 110 como se muestra en la Tabla 3.24.

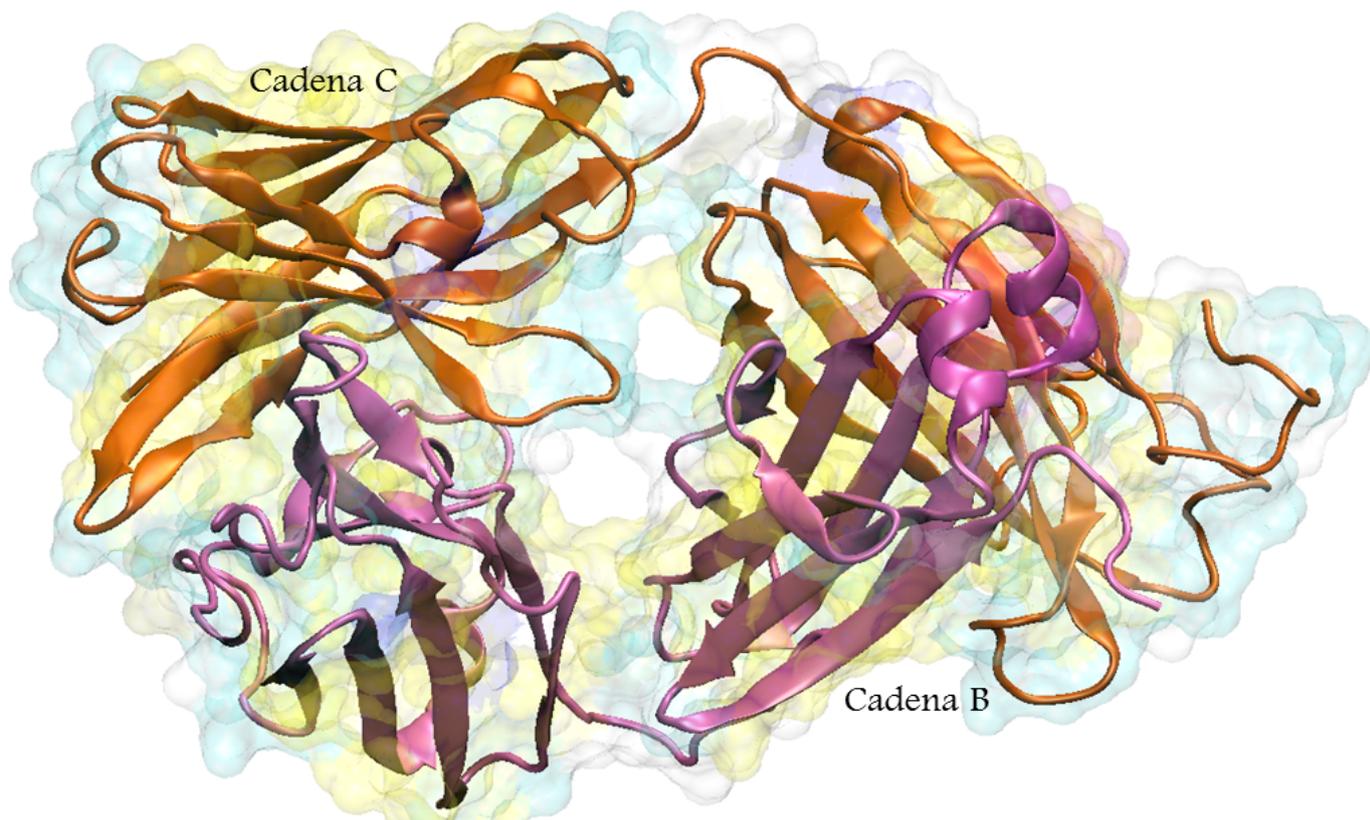


Figura 3.23: IgE. En morado está la cadena ligera nombrada como cadena B, en anaranjado está la cadena pesada nombrada como cadena C.

CDR	
Cadena B	91 - 101
Cadena C	99 - 110

Tabla 3.24: Sitio de complementariedad (CDR).

3.4.2. 17°C - 290.15 K

PatchDock es un algoritmo de acoplamiento molecular basado en complementariedad, el objetivo es encontrar transformaciones de acoplamiento que produzcan una buena complementariedad de forma molecular. Para poder estudiar las interacciones polcalcina - IgE se escogió las dos mejores soluciones basadas en datos proporcionados por este servidor como el score basado en la puntuación geométrica, penetración de la *Phl p 7* en la IgE, tamaño del área de la interfaz y la energía global dato proporcionado por FireDock, (Tabla 3.25).

La energía global se basa en las interacciones de van der Waals, la energía de contacto atómico (ACE), energía electrostática, contribución de los enlaces de hidrógeno y estimaciones adicionales de energía libre de enlace. La energía libre de enlace que se calcula en FireDock se puede aproximar a la energía libre de unión experimental mediante la suma de los componentes descritos anteriormente. La puntuación de unión obtenida esta correlacionada con la energía libre de unión experimental, el coeficiente de correlación obtenido es de 0.83¹⁰¹.

Al basarnos en las 10 primeras soluciones mejor ponderadas obtenidas de FireDock solo se escogieron dos soluciones, la solución dos y cinco como se visualizan en la Figura 3.24. Éstas presentan la estructura de la *Phl p 7* sometida a 17 °C. Con PDBsum se obtuvo las diferentes interacciones como: enlaces de hidrógeno, puentes de sal y interacciones hidrofóbicas. Este análisis se hizo entre la *Phl p 7* y la IgE, como se muestra en la Tabla 3.26 y uno más específico entre el CDR y la *Phl p 7*, como se muestra en la Tabla 3.27.

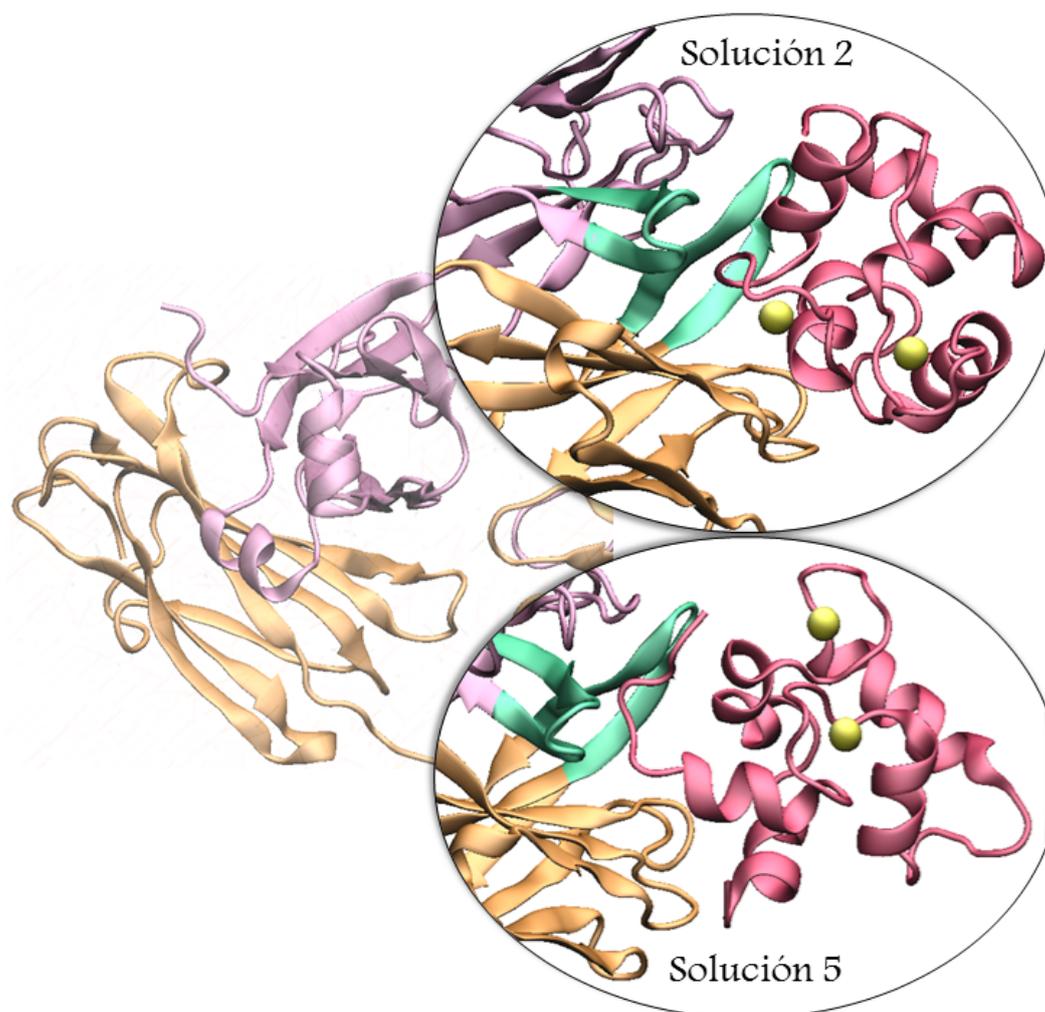


Figura 3.24: Estructura cuaternaria del complejo polcalcina-IgE. En color rosa se muestra a la polcalcina sometida a 17 °C; los calcio están representados por esferas amarillas; la IgE consta de la cadena B (morado) y la cadena C (anaranjado), que posee el CDR que está resaltado de celeste.

N°	Score	Penetración	Área Å ²	Energía global
Sol 2	6086	-3.18	919.60	-59.33
Sol 5	6040	-2.90	809.20	-58.24

Tabla 3.25: Datos generales de las dos soluciones elegidas a temperatura de 17 °C. Score, penetración y área de interfaz son datos generados por PatchDock; la energía global es un dato generado por FireDock.

Al comparar los datos obtenidos por el servidor PDBsum (Tabla 3.26 y 3.27), se puede visualizar como la solución 2 es la que presenta mayor contactos en el complejo *Phl p 7*-IgE; con un total de 320 interacciones hidrofóbicas, nueve enlaces de hidrógeno y dos puentes de sal. En el caso de solo el *Phl p 7*-CDR las interacciones constan de 196 interacciones

hidrofóbicas y tres enlaces de hidrógeno. Por otro lado, la solución 5 presenta entre *Phl p 7-IgE* 128 interacciones hidrofóbicas, en cambio en *Phl p 7-CDR* solo 43 y un enlace de hidrógeno.

N°	Contactos entre <i>Phl p 7-IgE</i>					
	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 2	2	1	48	7	1	272
Sol 5	0	0	26	4	1	102

Tabla 3.26: Contactos entre *Phl p 7-IgE*. Estructura de la polcalcina después de ser sometida a 17 °C en interacción con la IgE.

N°	Contactos entre la <i>Phl p 7-CDR</i>					
	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 2	1	0	32	2	0	164
Sol 5	0	0	10	1	0	33

Tabla 3.27: Contactos entre el *Phl p 7-CDR* Estructura de la polcalcina después de ser sometida a 17 °C en interacción con la IgE.

3.4.3. 37 °C - 310.15 K

Se escogieron dos soluciones, la solución 2 y 3 (Figura 3.25), estas dos soluciones fueron analizadas tomando en cuenta los datos de FireDock y PatchDock (Tabla 3.28). Mediante el servidor PDBsum se estudio los contactos entre la *Phl p 7-IgE*, (Tabla 3.29) y uno más específico entre la *Phl p 7-CDR*, (Tabla 3.30).

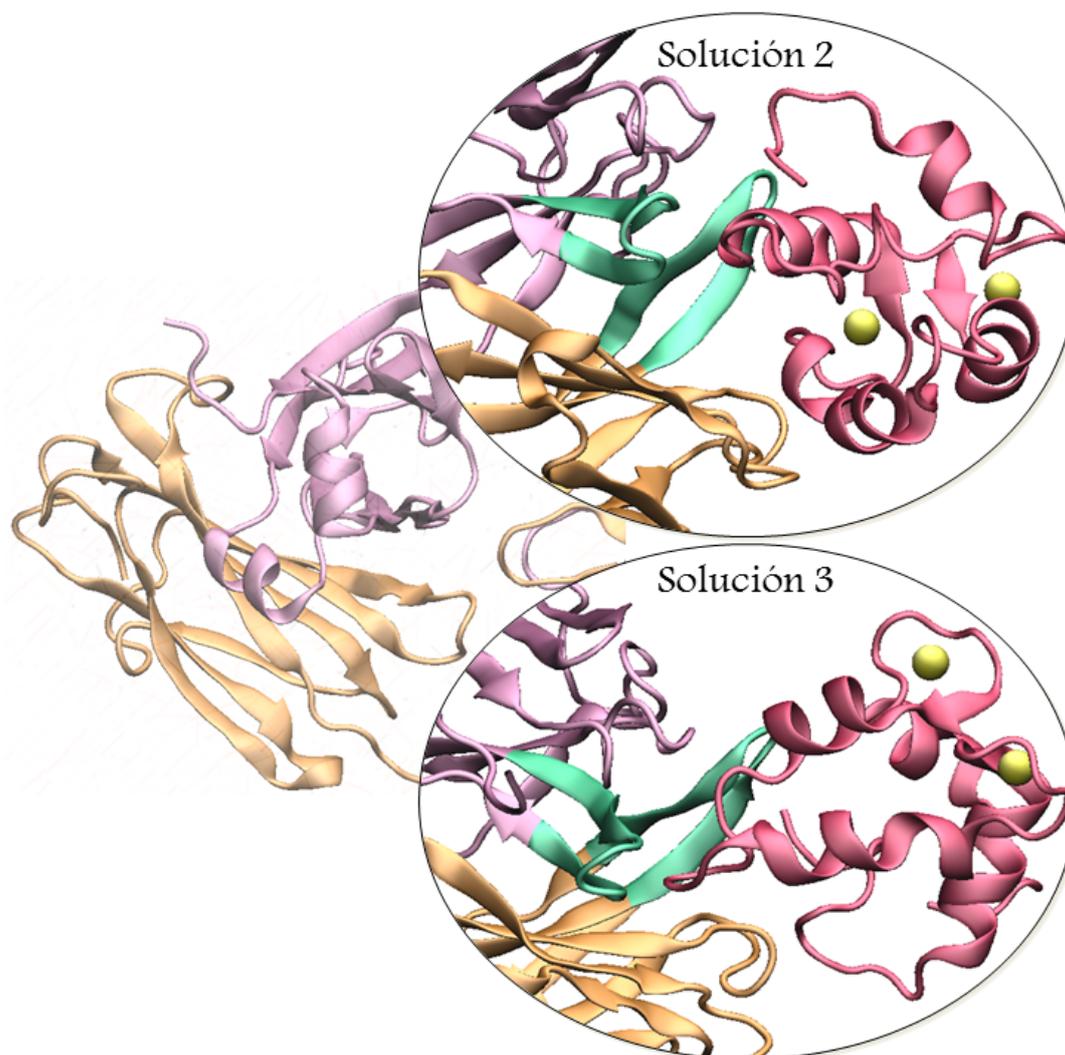


Figura 3.25: Estructura cuaternaria del complejo polcalcina-IgE. En color rosa se muestra a la polcalcina a 37 °C; los calcio están representados por esferas amarillas; la IgE consta de la cadena B (morado) y la cadena C (anaranjado), que posee el CDR que está resaltado de celeste.

N°	Score	Penetración	Área Å ²	Energía global
Sol 2	9772	-2.74	1320.60	-59.56
Sol 3	7154	-2.86	963.00	-56.69

Tabla 3.28: Datos generales de las dos soluciones elegidas a 37 °C. Score, penetración y área de interfaz son datos generados por PatchDock; la energía global es un dato generado por FireDock.

Al hacer una comparación entre estas dos diferentes soluciones, se puede visualizar como la solución 2 presenta un total de 164 interacciones hidrofóbicas y cinco enlaces de hidrógeno en el complejo *Phl p 7*-IgE. En el caso de la *Phl p 7*-CDR, las interacciones

constan de 65 interacciones hidrofóbicas y un enlace de hidrógeno. Por otro lado la solución 3 presenta 174 interacciones hidrofóbicas y seis enlaces de hidrógeno en total entre *Phl p 7-IgE*, en cambio en *Phl p 7-CDR* presenta 128 interacciones hidrofóbicas y un enlace de hidrógeno.

Contactos entre <i>Phl p 7-IgE</i>						
N°	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 2	2	0	22	5	0	142
Sol 3	1	0	47	5	0	127

Tabla 3.29: Contactos entre *Phl p 7-IgE*. Estructura de la polcalcina después de ser sometida a 37 °C en interacción con la IgE.

Contactos entre <i>Phl p 7-CDR</i>						
N°	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 2	1	0	12	0	0	53
Sol 3	0	0	21	1	0	107

Tabla 3.30: Contactos entre *Phl p 7-CDR* Estructura de la polcalcina después de ser sometida a 37 °C en interacción con la IgE.

3.4.4. 57.9 °C - 331.05 K

Se escogieron dos soluciones, la solución 1 y 9 (Figura 3.26), estas dos soluciones fueron analizadas tomando en cuenta los datos de FireDock y PatchDock (Tabla 3.31). Mediante PDBsum se hizo una análisis de contacto entre la *Phl p 7-IgE*, (Tabla 3.32) y uno más específico entre la *Phl p 7-CDR*, (Tabla 3.33).

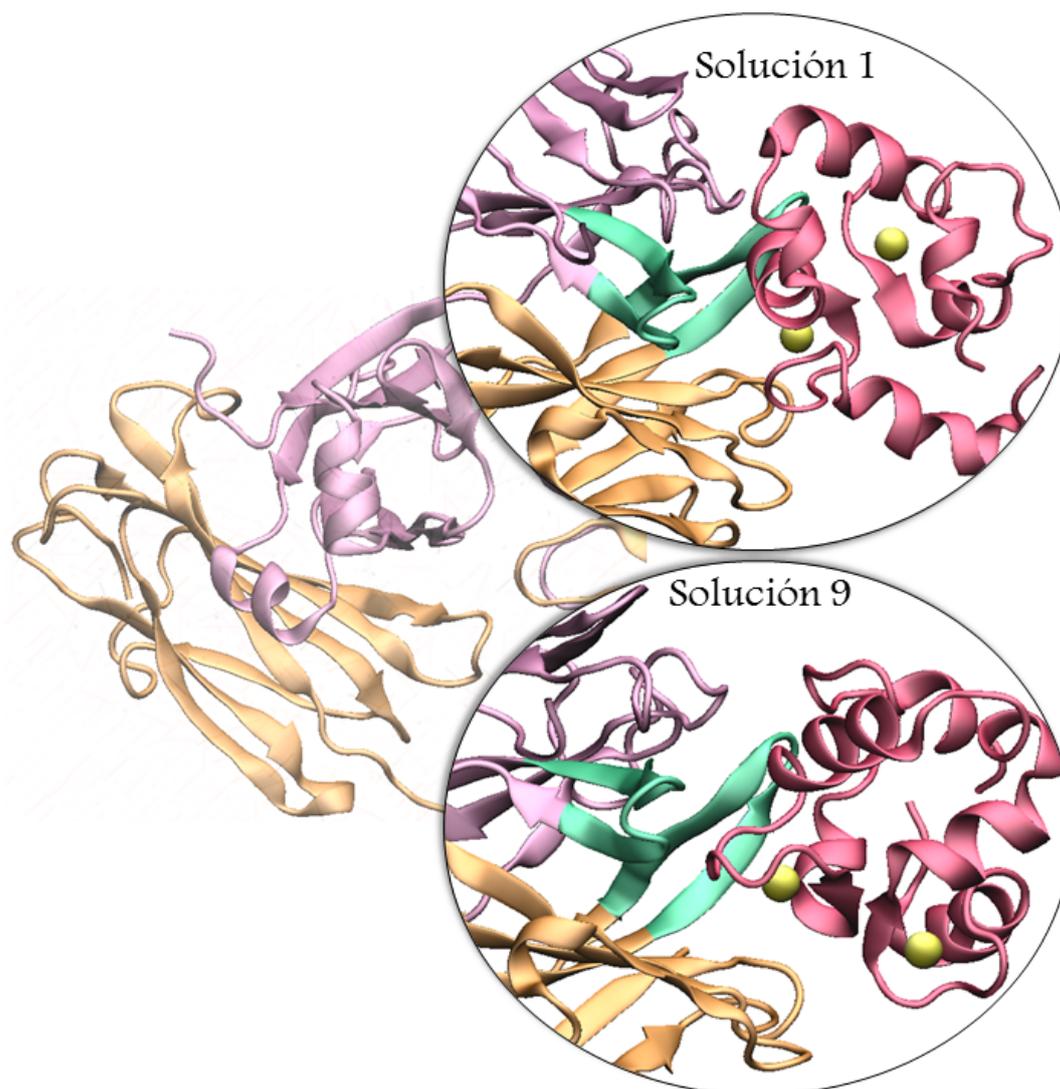


Figura 3.26: Estructura cuaternaria del complejo polcalcina-IgE. En color rosa se muestra a la polcalcina a 57.9 °C; los calcio están representados por esferas amarillas; la IgE consta de la cadena B (morado) y la cadena C (anaranjado), que posee el CDR que está resaltado de celeste.

N°	Score	Penetración	Área Å ²	Energía global
Sol 1	7954	-3.35	1265.30	-64.89
Sol 9	6400	-2.95	941.20	-54.33

Tabla 3.31: Datos generales de las dos soluciones elegidas a 57.9 °C. Score, penetración y área de interfaz son datos generados por PatchDock; la energía global es un dato generado por FireDock.

Al hacer una comparación entre estas dos diferentes soluciones, se puede visualizar como la solución 1 presenta un total de 210 interacciones hidrofóbicas y siete enlaces

de hidrógeno para el complejo *Phl p 7*-IgE. En el caso de solo la *Phl p 7*-CDR, consta de 117 interacciones hidrofóbicas y seis enlace de hidrógeno. La solución 9 presenta 148 interacciones hidrofóbicas, cinco enlaces de hidrógeno y dos puentes de sal en total en el complejo *Phl p 7*-IgE. Por otro lado en el complejo *Phl p 7*-CDR se presentan 102 interacciones hidrofóbicas y tres enlace de hidrógeno.

Contactos entre <i>Phl p 7</i> -IgE						
N°	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 1	4	0	81	3	0	129
Sol 9	3	0	48	2	2	100

Tabla 3.32: Contactos entre *Phl p 7*-IgE. Estructura de la polcalcina después de ser sometidas a 57.9 °C en interacción con la IgE.

Contactos entre <i>Phl p 7</i> -CDR						
N°	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 1	4	0	32	2	0	85
Sol 9	2	0	25	1	0	77

Tabla 3.33: Contactos entre *Phl p 7*-CDR. Estructura de la polcalcina después de ser sometidas a 57.9 °C en interacción con la IgE.

3.4.5. 77.3 °C - 350.45 K

Se escogieron dos soluciones, la solución 3 y 6 (Figura 3.27), estas dos soluciones fueron analizadas tomando en cuenta los datos de FireDock y PatchDock (Tabla 3.34). Mediante PDBsum se analizó las diferentes interacciones como: enlaces de hidrógeno, puentes de sal e interacciones hidrofóbicas. Este análisis se hizo en el complejo *Phl p 7*-IgE, (Tabla 3.35) y uno más específico entre la *Phl p 7*-CDR, (Tabla 3.36).

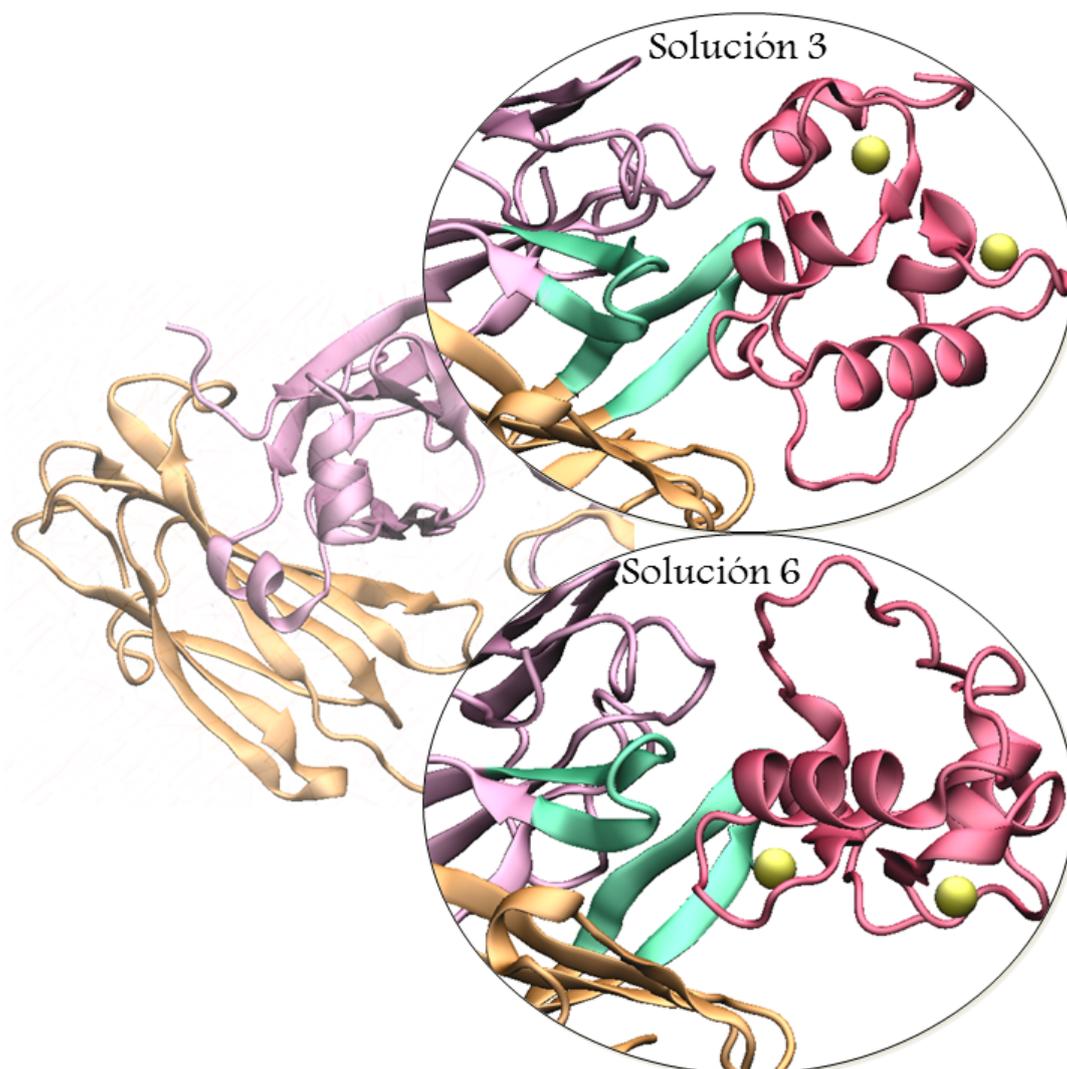


Figura 3.27: Estructura cuaternaria del complejo polcalcina-IgE. En color rosa se muestra a la polcalcina a 77.3 °C; los calcio están representados por esferas amarillas; la IgE consta de la cadena B (morado) y la cadena C (anaranjado), que posee el CDR que está resaltado de celeste.

N°	Score	Penetración	Área Å ²	Energía global
Sol 3	6004	-2.80	782.30	-70.18
Sol 6	6456	-2.78	882.00	-64.46

Tabla 3.34: Datos generales de las dos soluciones elegidas a 77.3 °C. Score, penetración y área de interfaz son datos generados por PatchDock; la energía global es un dato generado por FireDock.

Al hacer una comparación entre estas dos diferentes soluciones, se puede visualizar como la solución 3 presenta un total de 237 interacciones hidrofóbicas y cuatro enlaces de hidrógeno para el complejo *Phl p 7*-IgE. En el caso de solo la *Phl p 7*-CDR, consta

de 142 interacciones hidrofóbicas y cinco enlace de hidrógeno. La solución 6 presenta 180 interacciones hidrofóbicas, seis enlaces de hidrógeno y un puentes de sal en total en el complejo *Phl p 7*-IgE, *Phl p 7* -CDR presenta 99 interacciones hidrofóbicas y tres enlace de hidrógeno. Aunque la estructura utilizada para este acoplamiento es la que sufrió mayor pérdida de estructura terciaria por someterla a una alta temperatura aun así presenta una gran cantidad de contactos con la IgE.

Contactos entre <i>Phl p 7</i> -IgE						
N°	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 3	0	0	79	4	0	158
Sol 6	4	0	84	2	1	96

Tabla 3.35: Contactos entre *Phl p 7*-IgE. Estructura de la polcalcina después de ser sometidas a 77.3 °C en interacción con la IgE.

Contactos entre <i>Phl p 7</i> -CDR						
N°	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 3	0	0	1	4	0	141
Sol 6	2	0	47	1	0	52

Tabla 3.36: Contactos entre *Phl p 7*-CDR. Estructura de la polcalcina después de ser sometidas a 77.3 °C en interacción con la IgE.

3.4.6. 97.3 °C - 370.45 K

Se escogieron dos soluciones, la solución 9 y 10 (Figura 3.28). Se visualiza que la *Phl p 7* tiene una gran área de interfaz y una penetración grande dentro del CDR en las dos soluciones y en el caso de la solución 9 es el primer bucle el que tiene gran contacto con el CDR. Éstas fueron analizadas tomando en cuenta datos de FireDock y PatchDock (Tabla 3.37). Con el servidor PDBsum se hizo un análisis de las diferentes interacciones como: enlaces de hidrógeno, puentes de sal e interacciones hidrofóbicas. Esto se hizo entre la *Phl p 7*-IgE, (Tabla 3.38) y uno más específico entre la *Phl p 7*-CDR, (Tabla 3.39).

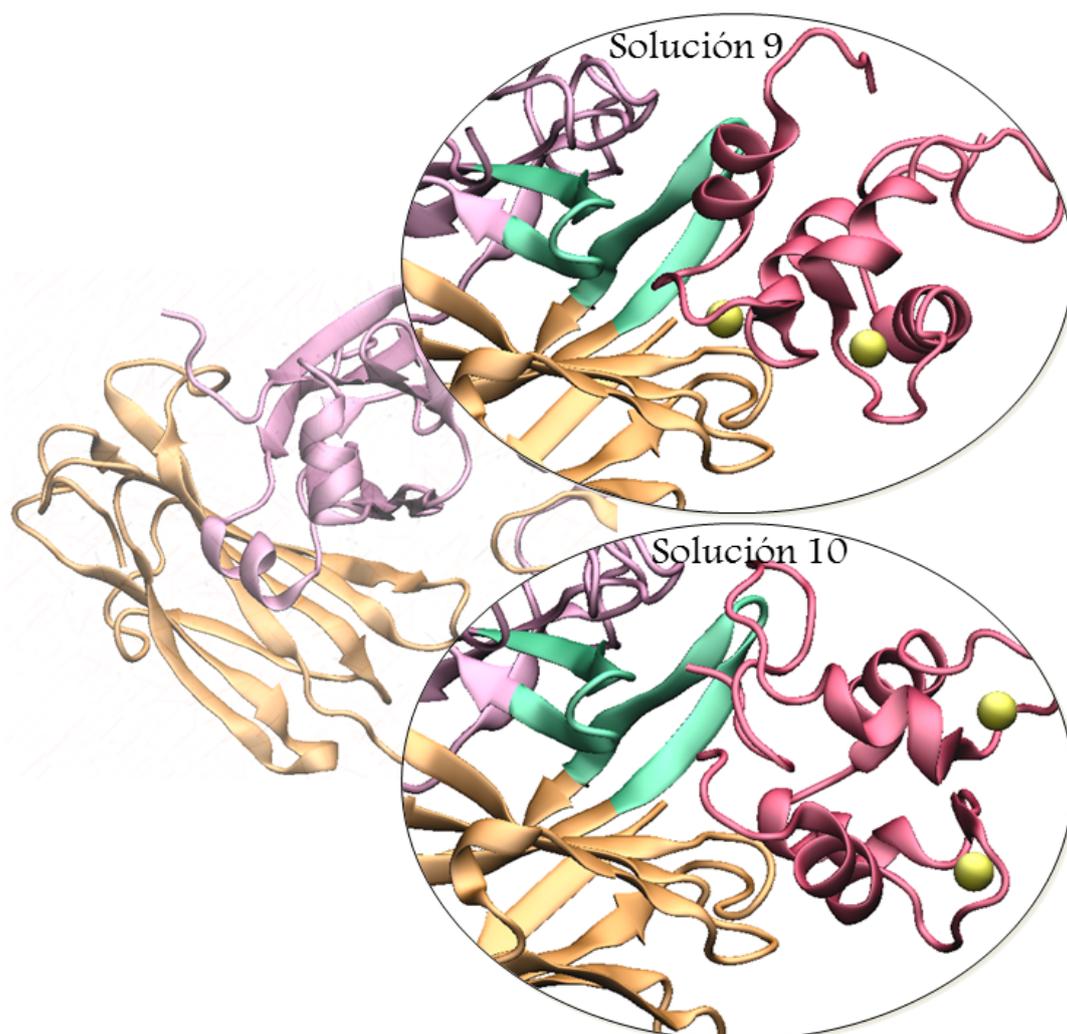


Figura 3.28: Estructura cuaternaria del complejo polcalcina-IgE. En color rosa se muestra a la polcalcina a 97.3 °C; los calcio están representados por esferas amarillas; la IgE consta de la cadena B (morado) y la cadena C (anaranjado), que posee el CDR que está resaltado de celeste.

N°	Score	Penetración	Área Å ²	Energía global
Sol 9	8164	-2.62	1091.90	-65.45
Sol 10	7882	-3.45	1186.10	-63.87

Tabla 3.37: Datos generales de las dos soluciones elegidas a 97.3 °C. Score, penetración y área de interfaz son datos generados por PatchDock; la energía global es un dato generado por FireDock.

Al hacer una comparación entre estas dos diferentes soluciones, se puede visualizar como la solución 9 presenta un total de 237 interacciones hidrofóbicas, 12 enlaces de hidrógeno y dos puentes de sal para el complejo *Phl p 7*-IgE. En el caso de solo la *Phl p*

7-CDR, consta de 104 interacciones hidrofóbicas y 6 enlace de hidrógeno. La solución 10 presenta 218 interacciones hidrofóbicas, cuatro enlaces de hidrógeno y un puente de sal en total en el complejo *Phl p 7-IgE*, *Phl p 7-CDR* presenta 70 interacciones hidrofóbicas. Esta es la estructura que fue obtenida después de someterla a la mayor temperatura, no es la que más presenta una pérdida de su estructura terciaria pero si presenta una pérdida considerable y aun así presenta una gran cantidad de contactos con la IgE en las dos soluciones escogidas.

Contactos entre <i>Phl p 7-IgE</i>						
N°	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 9	3	1	49	9	1	188
Sol 10	1	0	55	3	1	163

Tabla 3.38: Contactos entre *Phl p 7-IgE*. Estructura de la polcalcina después de ser sometidas a 97.3 °C en interacción con la IgE.

Contactos entre <i>Phl p 7-CDR</i>						
N°	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 9	2	0	13	4	0	91
Sol 10	0	0	9	0	0	61

Tabla 3.39: Contactos entre *Phl p 7-CDR* Estructura de la polcalcina después de ser sometidas a 97.3 °C en interacción con la IgE.

3.5. Dinámica molecular de estructuras cuaternarias

La formación del complejo antígeno-anticuerpo se define como una reacción química espontánea. Para que esta reacción ocurra de manera espontánea, la suma de todas las interacciones químicas debe resultar en un cambio negativo en la energía libre. Las fuerzas que unen el complejo antígeno-anticuerpo no son enlaces covalentes fuertes, sino enlaces más débiles, apropiadamente denominados “interacciones débiles”¹⁰². Según la mecánica cuántica, todos los enlaces químicos se basan en fuerzas electrostáticas como las fuerzas de van der Waals que son las débiles pero pueden atraer todo tipo de moléculas¹⁰³. También tenemos a los enlaces de hidrógeno o ión-dipolo que requieren átomos con carga opuesta. Los enlaces de hidrógeno son muy importantes en soluciones acuosas porque el agua

forma fácilmente enlaces de hidrógeno fuerte, además ésta es una de las interacciones más importantes para inducir la función biológica de enzimas. Una red rica en enlaces de hidrógeno estabilizaría la estructura de unión de un complejo.

3.5.1. 17°C - 290.15 K

Después de someter nuestras estructuras a un análisis de MM/PBSA, para la solución 2 y 5 se obtuvo una energía de unión bastante favorables, lo que nos da indicios de una unión espontánea. Si profundizamos en las energías que se observa, las energías electrostáticas son más negativas que las energías de van der Waals en la dos soluciones (Tabla 3.40).

	Solución 2 (kJ/mol)	Solución 5 (kJ/mol)
Energía de van der Waals	-348.851 ± 34.365	-203.273 ± 2.472
Energía electrostática	-1565.373 ± 130.189	-1504.885 ± 14.744
Energía de solvatación polar	650.209 ± 61.387	557.295 ± 8.529
Energía SAV	-293.141 ± 50.172	-228.136 ± 12.354
Energía de unión	-1557.156 ± 130.189	-1377.908 ± 19.006

Tabla 3.40: Energía de unión (kJ/mol) de la solución 2 y 5, *Phl p 7* sometida a 17 °C.

Un factor importante es que se dé la interacción entre la *Phl p 7*-CDR de la IgE, ya que este el sitio donde están las regiones de complementariedad. En el caso de la solución 5, como se visualiza en la Figura 3.29 no hay un contacto con todo el CDR, ya que el CDR implica diferentes residuos tanto en la cadena B como en la cadena C. Al visualizar la película después de la DM se aprecia como la *Phl p 7* no es estable respecto a su unión con la IgE y esta se va alejando de ésta hasta solo mantener contacto con la cadena C. Cuando se visualizó la película de la solución 2 se aprecia una gran estabilidad respecto a la unión de la *Phl p 7* con la IgE, y como se muestra en la imagen mantiene la unión con las dos cadenas que integra el CDR.

Cada residuo que participa en la interacción con el CDR ha sido representado con método de dibujo Licorice para visualizar mejor la estructura química de los residuos. A cada residuo se le calculó su energía MM/PBSA y este se representa por una escala de colores que va desde rojo (200 kJ/mol) hasta azul (-200 kJ/mol). Mientras más tonalidades azules se vean en la representación, es signo de más energías negativas entre los residuos, la que indica una mayor energía de unión. En las dos soluciones se visualiza muchas tonalidades azules lo que corresponde a que las interacciones son altamente favorables.

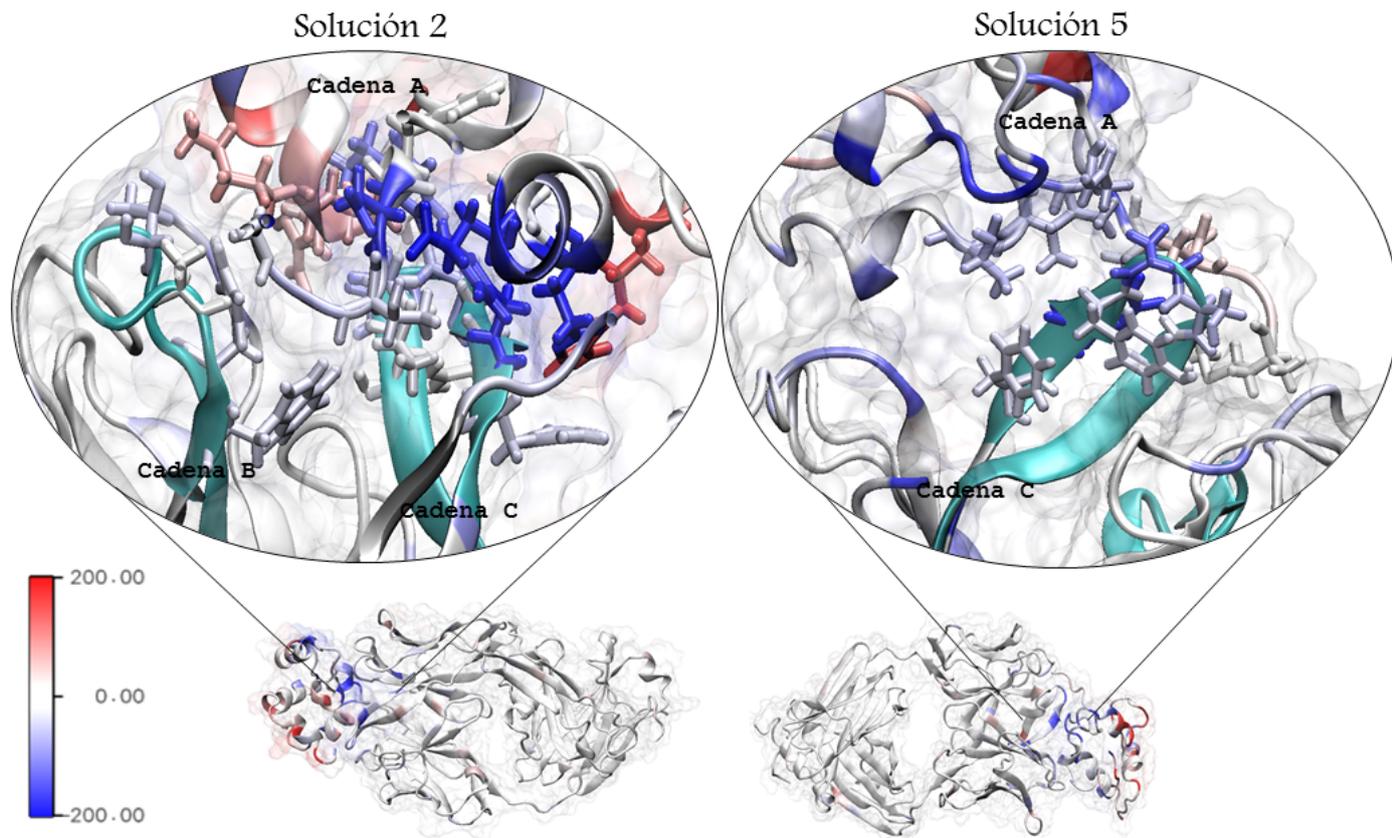


Figura 3.29: Visualización de la contribución de energía de cada residuo en la interacción *Phl p 7*-CDR en una escala de colores que va desde 200 a -200 kJ/mol según el valor de las energías.

Con PDBsum se observa los contactos que se produjeron después de la DM. En la solución 2 se dio la formación de enlaces de hidrógeno ya que pasó de tener 9 enlaces hidrógeno entre *Phl p 7*-IgE a tener 20 como se visualiza en la Tabla 3.41. Las interacciones hidrofóbicas son los que se redujeron pero se dio el aumento de un puente de sal pasando a tres. En el caso de solo el complejo *Phl p 7*-CDR igualmente se generó la formación de enlaces de hidrógeno ya que pasó de tres al inicio de la DM, a siete.

Con respecto a la solución 5, en la interacción *Phl p 7*-IgE se ve una pérdida de las interacciones hidrofóbicas pero un incremento en los enlaces de hidrógeno que aumento a cinco, pero como se observa en la Tabla 3.42 perdió casi todo contacto con el CDR.

Contactos entre <i>Phl p 7-IgE</i>						
N°	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 2	4	1	33	16	2	122
Sol 5	3	0	9	2	1	38

Tabla 3.41: Contactos en el complejo *Phl p 7-IgE* después de la DM.

Contactos entre <i>Phl p 7-CDR</i>						
N°	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 2	3	0	18	4	0	62
Sol 5	0	0	0	0	0	25

Tabla 3.42: Contactos en el complejo *Phl p 7-CDR* después de la DM.

Con LigPlot obtuvimos de forma gráfica nos dio los residuos que interaccionan entre la *Phl p 7-CDR*. En la solución 2, son 13 residuos de la *Phl p 7* que interaccionan con el CDR; de éstos, son siete residuos los que han creado una enlace de hidrógeno con el CDR los cuales fueron: Lys12, Arg13, Phe14, Thr16, Gly18, Glu29 y Arg32, como se muestra en la Tabla 3.43. Las energías de éstos residuos varían pero prevalece las energías negativas. En la cadena B que integra el CDR, se visualiza que son cuatro residuos los que interaccionan con la *Phl p 7* y tres de ellos generaron un enlace de hidrógeno (Thr95, Ser98 y Trp100), a excepción de la Ser98 todos presentan energías negativas. En la cadena C que integra el CDR son siete los residuos que interaccionan con la *Phl p 7*, siendo la Tyr101 y Ser104 los residuos que crearon un enlace de hidrógeno. A excepción de la Tyr102 todos presentan energías negativas.

En la solución 5 son seis los residuos de la *Phl p 7* que interaccionan con seis residuos del CDR, pero ninguno generó un enlace de hidrógeno. Se perdió cualquier contacto con la cadena B que integra el CDR, las energías en general fueron negativas a excepción de la Met1 y Ala3.

Solución 2				Solución 5	
Cadena A	Cadena B	Cadena C	Cadena A	Cadena C	
Lys12	Ala30	Phe93	Phe100	Met1	Phe100
128.08	-3.19	-7.63	-16.48	24.00	-44.73
Arg13	Arg32	Thr95	Tyr101	Ala3	Tyr101
52.63	128.38	-18.41	-59.56	52.02	-195.49
Phe14	Val79	Ser98	Tyr102	Ala5	Tyr102
-12.29	-4.31	3.64	5.54	-39.76	-49.29
Asp15	Phe80	Trp100	Ser103	Asn60	Ser103
-224.02	-120.90	-15.27	-3.01	-68.20	-154.77
Thr16		Ser104		Ile63	Ser104
-43.23		-22.87		-58.07	-71.35
Asn17		Gly105		Thr64	Gly105
-32.63		-11.96		-71.34	-40.25
Gly18		Val106			
-25.19		-13.06			
Glu26					
-265.03					
Glu29					
-198.99					

Tabla 3.43: Residuos que han tenido algún contacto en la interacción *Phl p 7*-CDR, la cadena A es la *Phl p 7* y el CDR está formado por dos cadenas tanto la B como la C. Las energías en kJ/mol se encuentran debajo de cada residuo y resaltados en rojo son los que formaron un enlace de hidrógeno.

La razón de la diferencia en el número de enlaces de hidrógeno entre el complejo *Phl p 7*-IgE y *Phl p 7*-CDR, se debe a que *Phl p 7*-IgE tiene un área de contacto mayor. De acuerdo con la clasificación de enlaces de hidrógeno, Jeffrey¹⁰⁴ y Frey¹⁰⁵, el “enlace de hidrógeno de un solo pozo” es muy corto, típicamente con una distancia de 2.4 a 2.5 Å. El “enlace de hidrógeno de barrera baja”, LBHB, es más largo que el enlace de hidrógeno de un solo pozo y la distancia varía de 2.5 a 2.6 Å. El “enlace de hidrógeno débil” tiene una distancia incluso mayor que las de los dos tipos de enlaces de hidrógeno anteriores y es superior a 2.6 Å.

Los LBHB tienen una característica similar a un enlace covalente y contribuye significativamente a la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo, de los siete enlaces de hidrógeno formados solo uno entra en esta categoría. La Phe14 de la cadena A con con la Tyr101 de la cadena C generaron un enlace de hidrógeno con una distancia de 2.59 Å como se visualiza en la Tabla 3.44, resaltado en amarillo. Los demás enlaces de hidrógeno son de carácter débil ya que la distancias son mayores a 2.6 Å. En el caso de la solución 5, no se dio la formación de ningún enlace de hidrógeno con el CDR.

Enlaces de hidrógeno entre <i>Phl p 7</i> -CDR												
	N°	N.	N.	N°	C	N°	N.	N.	N°	C		
	ATM	ATM	Res.	Res.	a	ATM	ATM	Res.	Res.	a	Å	
					e					e		
					n					n		
					a					a		
	187	NZ	Lys	12	A	-	2541	OG1	Thr	95	B	2.73
	262	O	Thr	16	A	-	2608	NE1	Trp	100	B	2.76
	277	N	Gly	18	A	-	2589	O	Ser	98	B	2.94
Sol 2	206	NE	Arg	13	A	-	5940	O	Ser	104	C	2.70
	236	O	Phe	14	A	-	5894	OH	Tyr	101	C	2.59
	444	OE1	Glu	29	A	-	5877	N	Tyr	101	C	3.06
	496	NH2	Arg	32	A	-	5897	O	Tyr	101	C	2.78
Sol 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.44: Enlaces de hidrógeno formados entre *Phl p 7*-CDR. Se presenta el número de átomo, nombre del átomo, nombre del residuo, número de residuo, la cadena a la que pertenece y la distancia entre cada átomo que formó el enlace de hidrógeno. En amarillo esta resaltado el enlace de tipo LBHB.

3.5.2. 37 °C - 310.15 K

Después de someter nuestras estructuras a un análisis de MM/PBSA, para la solución 2 y 3 se obtuvo una energía de unión bastante favorable como se observa en la Tabla 3.45, lo que nos da indicios de una unión espontánea en las dos soluciones, aunque no significa que esta interacción sea específicamente entre la unión de la *Phl p 7*-CDR. Si profundizamos en las energías que se toman en cuenta, se observa que las energías electrostáticas son más bajas que las energías de van der Waals.

	Solución 2 (kJ/mol)	Solución 3 (kJ/mol)
Energía de van der Waals	-153.938 ± 9.584	-195.505 ± 4.216
Energía electrostática	-1532.695 ± 80.007	-756.123 ± 22.751
Energía de solvatación polar	539.482 ± 29.361	309.829 ± 11.370
Energía SAV	-153.367 ± 17.865	-187.068 ± 25.084
Energía de unión	-1300.518 ± 72.952	-826.867 ± 130.189

Tabla 3.45: Energía de unión (kJ/mol) de la solución 2 y 3, *Phl p 7* sometida a 37 °C.

Un factor importante es que se dé la interacción entre la *Phl p 7*-CDR, ya que este el sitio en donde están las regiones de complementariedad. En el caso de la solución 3, como se visualiza en la Figura 3.30, no hay un contacto con todo el CDR. Al visualizar la película de la solución 3 después de la DM se aprecia como la *Phl p 7* no es estable

respecto a su unión con la IgE y ésta se va alejando hasta solo mantener contacto con la cadena C. Cuando se visualizó la película de la solución 2, se aprecia un ambiente parecido a la solución 3, ya que no se observa estabilidad entre la unión de *Phl p 7*-IgE. A diferencia de la solución 3, la solución 2 sí conserva un área de contacto entre los residuos de la cadena B que conforman el CDR con la *Phl p 7*, pero son muy pocos.

Las energías obtenida por MM/PBSA se visualizan según tonalidades (Figura 3.30). En la solución 2 se ve la prevalencia de tonalidades azules sinónimo de más presencia de energías negativas, en cambio en la solución 3 se ve algunas tonalidades rojas signo de presencias de energías desfavorables a la interacción.

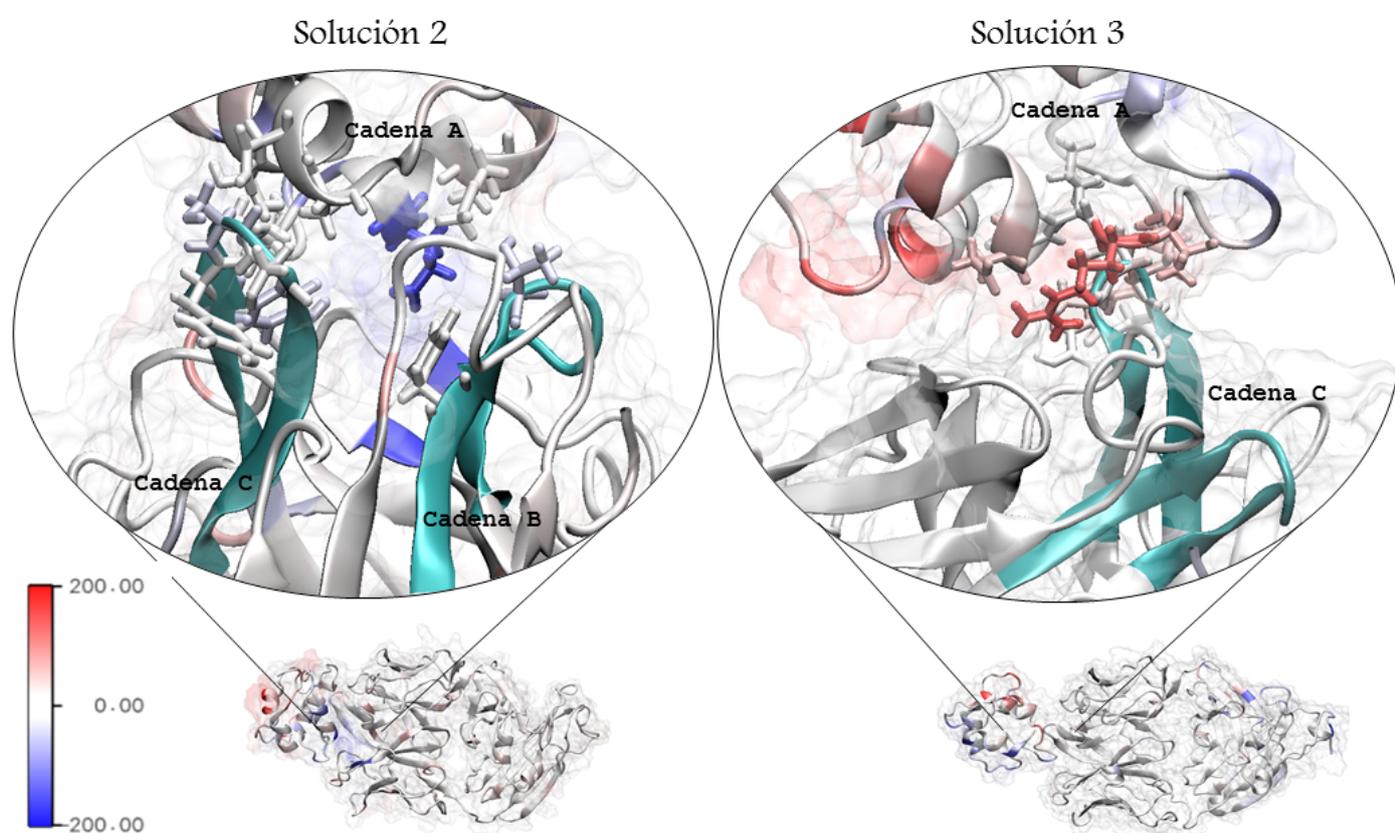


Figura 3.30: Visualización de la contribución de energía de cada residuo en la interacción *Phl p 7*-CDR en una escala de colores que va desde 200 a -200 kJ/mol según el valor de las energías.

Con PDBsum se obtuvo los contactos que se produjeron después de la DM. En la solución 2 se vio una pérdida de enlaces de hidrógeno ya que paso de tener cinco a tres en el complejo *Phl p 7*-IgE como se muestra en la Tabla 3.46. Así mismo ocurrió con las interacciones hidrofóbicas donde se dio una perdida drástica, pero se dio la formación de dos puentes de sal que antes no existían. En el caso de solo el complejo *Phl p 7*-CDR, solo estaban unidas por 17 interacciones hidrofóbicas y un enlace de hidrógeno.

Con respecto a la solución 3, en la interacción *Phl p 7*-IgE se ve una pérdida de los interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno, pasó de tener seis a solo tres. Hay pérdida de interacciones hidrofóbicas entre *Phl p 7*-CDR, de 174 que tenía al inicio de la DM pasó a 35. Aunque se dio la formación de dos enlaces de hidrógeno, como se observa en la Tabla 3.47 se dio una pérdida de contacto completa con la cadena B que integra el CDR.

Contactos entre <i>Phl p 7</i> -IgE						
N°	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 2	0	0	11	3	2	29
Sol 3	6	2	30	3	0	35

Tabla 3.46: Contactos entre *Phl p 7*-IgE después de la DM.

Contactos entre la <i>Phl p 7</i> -CDR						
N°	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 2	0	0	4	1	0	13
Sol 3	0	0	0	3	0	35

Tabla 3.47: Contactos entre *Phl p 7*-CDR después de la DM.

Con LigPlot se obtuvo de forma gráfica los residuos que interaccionan entre el complejo *Phl p 7*-CDR. En la solución 2, son seis residuos que interaccionan con el CDR; de estos solo Asn67 ha creado un enlace de hidrógeno con el CDR, las energías varían pero prevalece las energías negativas. En cuanto a la cadena B que integra el CDR; dos residuos son los que interaccionan con la *Phl p 7* y ninguno formó un enlace de hidrógeno, además presentan energías negativas. En la cadena C son cuatro los residuos que interaccionan con la *Phl p 7*, Ser103 fue el que creó un enlace de hidrógeno. En esta solución todos los residuos que interaccionan presentan energías negativas.

En la solución 3 son seis los residuos en la cadena A (*Phl p 7*) que interaccionan con la cadena C del CDR, tres de éstos crearon enlaces de hidrógeno (Ala30, Arg32 y Thr33). En la cadena A todos los residuos presentan energías positivas. En la cadena C solo la Ser103 es la que formó un enlace de hidrógeno. La Ser104 es el único residuo que presenta energía negativa, como se muestra en la Tabla 3.48.

Solución 2			Solución 3	
Cadena A	Cadena B	Cadena C	Cadena A	Cadena C
Met45	Phe93	Tyr101	Glu29	Tyr102
-30.59	-33.84	-89.39	71.59	8.08
Glu48	Thr95	Tyr102	Ala30	Ser103
-271.30	-85.98	-9.96	27.08	6.52
Thr51		Ser103	Leu31	Ser104
-28.93		-86.33	1.73	-8.39
Thr64		Ser104	Arg32	
-11.83		-27.99	153.24	
Asn67			Thr33	
-7.59			74.67	
Ala68			Phe80	
-30.93			61.99	

Tabla 3.48: Residuos que han tenido algún contacto en la interacción *Phl p 7*-CDR, la cadena A es la *Phl p 7* y el CDR está formado por dos cadenas tanto la B como la C. Las energías en kJ/mol se encuentran debajo de cada residuo y resaltados en rojo son los que formaron un enlace de hidrógeno.

Las dos soluciones solo presentarían “enlace de hidrógeno débil”, ya que éstos superan los 2.6 Å. En la Tabla 3.49 se muestra como Ser103 ha formado tres enlaces de hidrógeno en la solución 3 y uno en la solución 2.

Enlaces de hidrógeno entre <i>Phl p 7</i> -CDR											
	N°	N.	N.	N°	C	N°	N.	N.	N°	C	
	ATM	ATM	Res.	Res.	a	ATM	ATM	Res.	Res.	a	Å
					e					n	
					a					a	
Sol 2	997	ND2	Asn	67	A -	5929	O	Ser	103	C	2.86
	457	O	Ala	30	A -	5926	OG	Ser	103	C	3.03
Sol 3	477	N	Arg	32	A -	5929	O	Ser	103	C	2.76
	501	N	Thr	33	A -	5929	O	Ser	103	C	3.23

Tabla 3.49: Enlaces de hidrógeno formados entre *Phl p 7*-CDR. Se presenta número de átomo, nombre del átomo, nombre del residuo, número de residuo, la cadena a la que pertenece y distancia entre cada átomo que formó el enlace de hidrógeno.

3.5.3. 57.9 °C - 331.05 K

Después de someter nuestras estructuras a un análisis de MM-/PBSA, para la solución 1 y 9 se obtuvo una energía de unión bastante favorable, -1350.379 ± 17.916 kJ/mol y

-1802.22 \pm 41.33 kJ/mol respectivamente. Si profundizamos en las energías que se toman en cuenta se observa que las energías electrostáticas son más bajas que las interacciones de van der Waals (Tabla 3.50).

	Solución 1 (kJ/mol)	Solución 9 (kJ/mol)
Energía de van der Waals	-224.292 \pm 3.026	-225.160 \pm 5.261
Energía electrostática	-1439.237 \pm 17.434	-1845.337 \pm 48.734
Energía de solvatación polar	536.437 \pm 11.301	514.762 \pm 17.936
Energía SAV	-223.286 \pm 14.636	-246.485 \pm 18.912
Energía de unión	-1350.378 \pm 17.916	-1802.22 \pm 41.339

Tabla 3.50: Energía de unión (kJ/mol) de la solución 1 y 9, *Phl p 7* sometida a 57.9 °C.

En la película de la DM de la solución 1; la *Phl p 7* muestra estabilidad respecto a su posición inicial, como se muestra en la Figura 3.31 la separación entre ésta y la IgE no es muy grande, además que mantiene contacto con las dos cadenas que integran el CDR. En el caso de la solución 9 la película muestra poca conservación de la unión *Phl p 7*-CDR, además pierde todo contacto con la cadena B.

Las energías obtenidas por MM/PBSA se visualizan según tonalidades (Figura 3.31). En la solución 1 como 9 se ve la prevalencia de tonalidades azules sinónimo de más presencia de energías negativas, estas imágenes concuerdan con la energía de unión bastante favorable en la interacción.

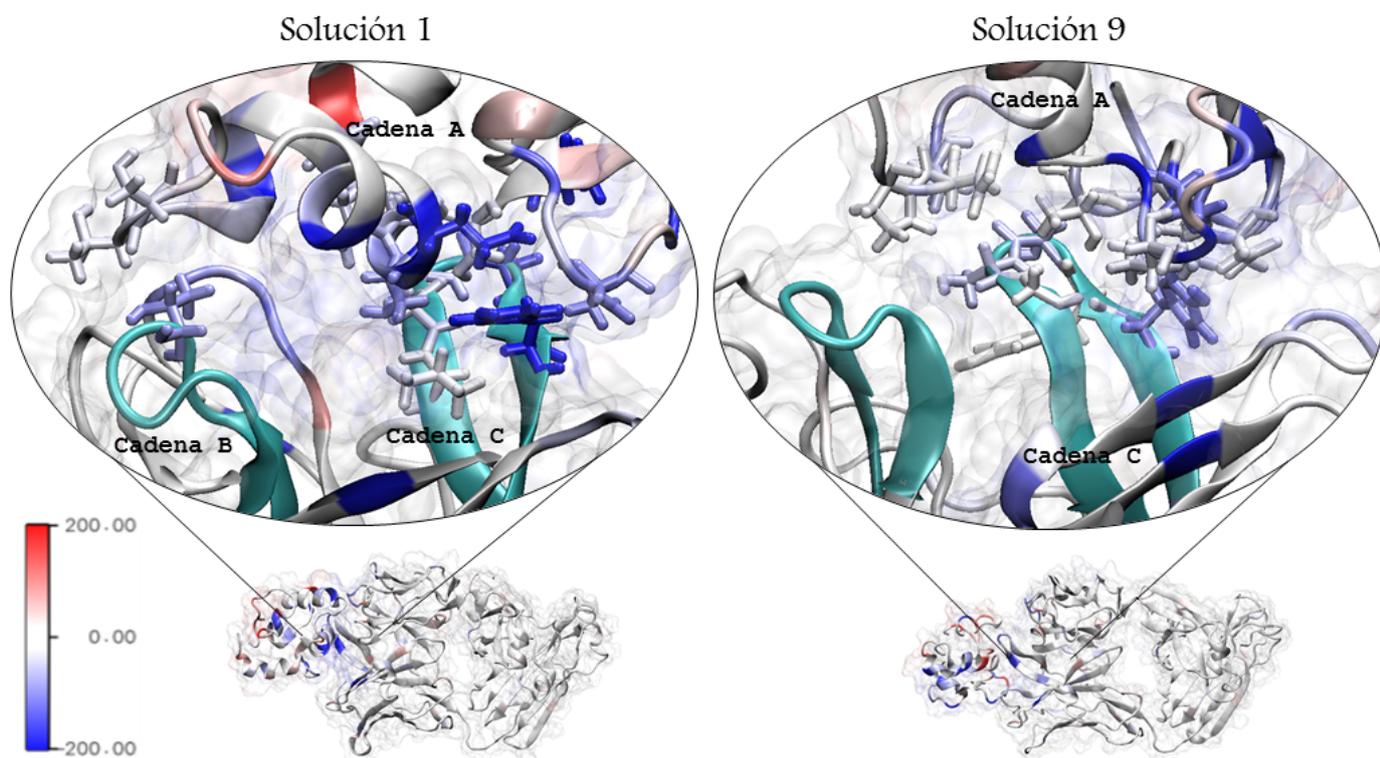


Figura 3.31: Visualización de la contribución de energía de cada residuo en la interacción *Phl p 7-CDR* en una escala de colores que va desde 200 a -200 kJ/mol según el valor de las energías.

Con PDBsum se obtuvo los contactos que se produjeron después de la DM. En la solución 1 se vio una conservación de los siete enlaces de hidrógeno entre *Phl p 7-IgE*, como se muestra en la Tabla 3.51. Hubo una disminución considerable entre las interacciones hidrofóbicas ya que pasó de 210 a solo 66. En el caso de la interacción *Phl p 7-CDR*; se dio la pérdida de enlaces de hidrógeno de seis al inicio de la DM a dos, igualmente esto se da con las interacciones hidrofóbicas paso de 117 a 36. Los contactos entre *Phl p 7-CDR* son muy pocos y casi perdió contacto con la cadena B.

Con respecto a la solución 9, en la interacción de *Phl p 7-IgE* se ve una pérdida de las interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno ya que pasó de tener cinco a cuatro enlaces de hidrógeno. En la interacción *Phl p 7-CDR* de 108 interacciones hidrofóbicas al inicio de la DM pasó a 35, aunque mantiene dos enlaces de hidrógeno con la cadena C, esta solución perdió cualquier tipo de contacto con la cadena B que integra el CDR, como se visualiza en la Tabla 3.52.

Contactos entre <i>Phl p 7-IgE</i>						
N°	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 1	2	0	18	5	2	48
Sol 9	0	0	0	4	0	52

Tabla 3.51: Contactos entre *Phl p 7-IgE* después de la DM.

Contactos entre <i>Phl p 7-CDR</i>						
N°	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 1	0	0	3	2	0	33
Sol 9	0	0	0	2	0	38

Tabla 3.52: Contactos entre *Phl p 7-CDR* después de la DM.

Con LigPlot se obtuvo los residuos que interactúan en el complejo *Phl p 7-CDR*. En la solución 1 la cadena A presenta nueve residuos que interactúan con el CDR, de estos dos han creado un enlace de hidrógeno (Ser23 y Gln43). Las energías varían pero prevalece las energías negativas en los residuos de la cadena A. En cuanto a la cadena B se visualiza que solo Thr95 es la que interactúa con la cadena A, este no genera ningún enlace de hidrógeno pero posee una energía negativa. En la cadena C son cinco los residuos que interactúan con la cadena A, Ser103 y Gly105 fueron los que crearon enlaces de hidrógeno. En esta solución todos los residuos que interactúan presentan energías negativas.

En la solución 9; son ocho los residuos de la cadena A que interactúan con la cadena C del CDR, dos crearon enlaces de hidrógeno (Thr51 y Thr 64). En la cadena A todos los residuos presentan energías negativas. En la cadena C son cinco los residuos que interactúan con la cadena A, Tyr101 y Tyr102 fueron los que crearon enlaces de hidrógeno. En esta solución todos los residuos que interactúan presentan energías negativas, como se visualiza en la Tabla 3.53.

Solución 1			Solución 9	
Cadena A	Cadena B	Cadena C	Cadena A	Cadena C
Asn17	Thr95	Tyr101	Thr51	Tyr101
-107.22	-99.58	-225.42	-82.48	-203.79
Ser23		Ser103	Asn60	Tyr102
-38.22		-159.09	-84.84	-17.82
Ser24		Ser104	Glu61	Ser103
-58.27		-69.96	-214.50	-174.45
Ser25		Gly105	Ile63	Ser104
-94.85		-43.48	-88.81	-118.08
Glu26		Val106	Thr64	Gly105
-209.80		-30.71	-61.34	-67.73
Ser36			Ala68	
-42.30			-95.39	
Thr37			Asn69	
-36.65			-11.95	
Gln43			Pro70	
-55.72			-67.14	
Asp54				
-208.78				

Tabla 3.53: Residuos que han tenido algún contacto en la interacción *Phl p 7*-CDR, la cadena A es la *Phl p 7* y el CDR está formado por dos cadenas tanto la B como la C. Las energías en kJ/mol se encuentran debajo de cada residuo y resaltados en rojo son los que formaron un enlace de hidrógeno.

De acuerdo con la clasificación de enlaces de hidrógeno citada anteriormente; las dos soluciones solo presentarían “enlace de hidrógeno débil”, ya que los cuatro enlaces que se formaron superan los 2.6 Å. En la solución 9 es Tyr 101 y 102 los que forman enlaces de hidrógeno con Thr51 y Thr64 respectivamente de la cadena A. En la solución 1 otra vez esta Ser103 formando una enlace de hidrógeno con Gln43, el segundo enlace esta dado entre Gly105 de la cadena C y Ser 23 de la cadena A, como se muestra en la Tabla 3.54.

Enlaces de hidrógeno entre <i>Phl p 7</i> -CDR											
	N°	N.	N.	N°	C	N°	N.	N.	N°	C	
	ATM	ATM	Res.	Res.	a	ATM	ATM	Res.	Res.	a	Å
					e					e	
					n					n	
					a					a	
Sol 1	351	OG	Ser	23	A -	5947	O	Gly	105	C	3.10
	642	NE2	Gln	43	A -	5929	O	Ser	103	C	2.90
Sol 9	774	OG1	Thr	51	A -	5894	OH	Tyr	101	C	2.73
	949	OG1	Thr	64	A -	5918	O	Tyr	102	C	3.18

Tabla 3.54: Enlaces de hidrógeno formados entre *Phl p 7*-CDR. Se presenta número de átomo, nombre del átomo, nombre del residuo, número de residuo, la cadena a la que pertenece y la distancia entre cada átomo que formó el enlace de hidrógeno.

3.5.4. 77.3 °C - 350.45 K

Después de someter nuestras estructuras a un análisis de MM/PBSA, para la solución 3 a comparación con las demás soluciones estudiadas hasta ahora es la única que presenta una energía de unión de -33.924 ± 39.625 kJ/mol, no tan favorable como las anteriores. La solución 6 obtuvo una energía de unión de -2151.488 ± 49.879 kJ/mol, bastante favorable comparable con las anteriores soluciones. Se sabe que para que una reacción sea espontánea debe tener la energía más negativa de unión posible, aunque la energía de esta solución no se compara con las obtenidas anteriormente sigue siendo favorable dando la posibilidad de que se dé la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

Si profundizamos en las energías que se toman en cuenta, se observa que en la solución 3 es en la única en donde las energías electrostáticas son más altas que las interacciones de van der Waals todo lo contrario sucede en la solución 6 donde la energía electrostática es mayor (Tabla 3.55).

	Solución 3 (kJ/mol)	Solución 6 (kJ/mol)
Energía de van der Waals	-43.021 ± 2.830	-308.724 ± 5.575
Energía electrostática	-41.289 ± 32.436	-2382.596 ± 51.512
Energía de solvatación polar	72.335 ± 8.808	878.512 ± 17.381
Energía SAV	-21.949 ± 26.872	-338.680 ± 15.124
Energía de unión	-33.924 ± 39.625	-2151.488 ± 49.879

Tabla 3.55: Energía de unión (kJ/mol) de la solución 3 y 6, *Phl p 7* sometida a 77.3 °C.

En la solución 3, como se visualiza en la Figura 3.32, hay un contacto con las dos cadenas que integra el CDR. Al visualizar la película después de la DM se aprecia como la

Phl p 7 es estable respecto a su unión con la IgE. En la película de la solución 6 se aprecia un ambiente parecido a la solución 3, ya que hay estabilidad en la unión del complejo *Phl p 7*-IgE, pero hay un ligero alejamiento de la *Phl p 7* de la unión con el CDR, aun así sigue manteniendo contacto con la cadena B.

Las energías obtenidas por MM/PBSA se visualizan en diferentes tonalidades para un análisis a grandes rasgos. En la solución 2, se ve gran prevalencia de tonalidades rojas entre los residuos que interaccionan con el CDR, esto se debe a que los residuos que participan en esta interacción poseen energías positivas (Figura 3.32). En cambio en la solución 6 se ve la prevalencia de tonalidades azules, sinónimo de más presencia de energías negativas.

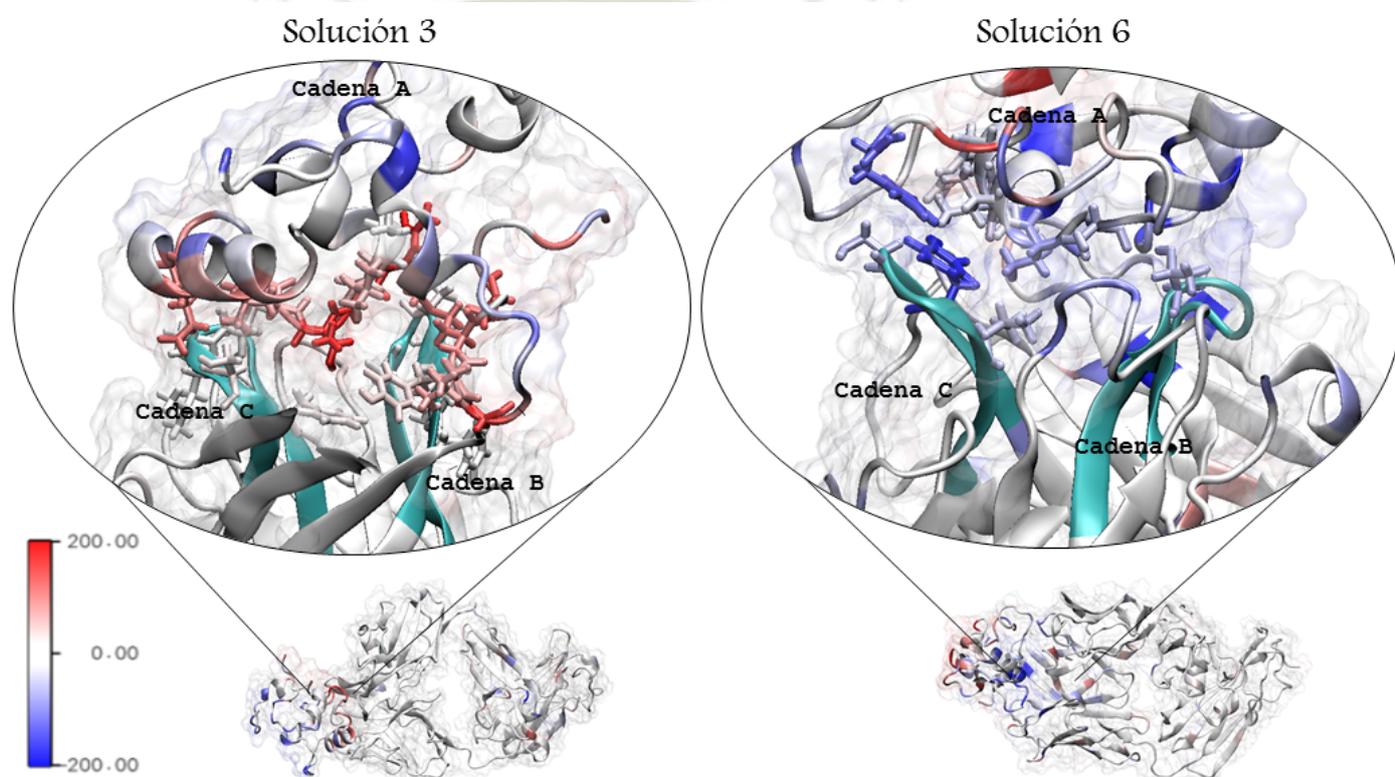


Figura 3.32: Visualización de la contribución de energía de cada residuo en la interacción *Phl p 7*-CDR en una escala de colores que va desde 200 a -200 kJ/mol según el valor de las energías.

Con PDBsum se obtuvo los contactos que se produjeron después de la DM. En la solución 3 se dio la formación de enlaces de hidrógeno ya que pasó de tener cuatro al inicio de la DM a nueve. Se dio la formación de dos puentes de sal pero hubo una pérdida de interacciones hidrofóbicas ya que pasó de 237 a 85 en el complejo *Phl p 7*-IgE (Tabla 3.56). En el caso de la interacción *Phl p 7*-CDR, se dio la formación de enlaces de hidrógeno paso de tener cinco a seis pero se dio la reducción de interacciones hidrofóbicas a solo 58.

Con respecto a la solución 6, en el complejo *Phl p 7*-IgE, se ve una pérdida de las

interacciones hidrofóbicas. En el caso del número enlaces de hidrógeno, pasó de tener seis a nueve. Hay pérdida de interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno en la interacción *Phl p 7*-CDR, ya que pasó de 99 a tener solo 14. Esta es el complejo donde casi no hay contactos con el CDR, como se ve en la Tabla 3.57.

Contactos entre <i>Phl p 7</i> -IgE						
N°	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 3	2	0	30	7	2	55
Sol 6	3	0	24	6	1	49

Tabla 3.56: Contactos entre *Phl p 7*-IgE después de la DM.

Contactos entre <i>Phl p 7</i> -CDR						
N°	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 3	2	0	24	4	0	34
Sol 6	0	0	3	0	0	11

Tabla 3.57: Contactos entre *Phl p 7*-CDR después de la DM.

Con LigPlot se obtuvo de forma gráfica los residuos que interaccionan en el complejo *Phl p 7*-CDR. En la solución 3, son 12 residuos de la cadena A que interaccionan con el CDR, de estos cuatro han creado una enlace de hidrógeno (Arg32, Glu41, Gl71 y Asp75). Las energías varían pero prevalece las energías positivas. La cadena B presentó cinco residuos que interaccionan con la cadena A, Ser98 formo un enlace de hidrógeno, los cinco residuos presenta energías positivas. En la cadena C son también cinco residuos que interaccionan con la cadena A, Ser103 y Tyr101 fueron los que crearon enlaces de hidrógeno. A excepción de Tyr102 todos los residuos que interaccionan poseen energías positivas.

En la solución 6 son seis los residuos de la cadena A que interaccionan con el CDR pero no formaron ningún enlace de hidrógeno. Solo un residuo en la cadena B interacciona con la cadena A, en la cadena C son tres residuos los que interaccionan. En la interacción de *Phl p 7*-CDR todos los residuos presentan energías negativas, como se visualiza en la Tabla 3.58.

Solución 3			Solución 6		
Cadena A	Cadena B	Cadena C	Cadena A	Cadena B	Cadena C
Ala30	Phe93	Phe100	Phe59	Thr95	Tyr101
12.36	30.99	8.08	-36.85	-81.89	-206.88
Leu 31	Thr95	Tyr101	Asn60		Ser103
79.29	26.05	47.96	-63.37		-70.94
Arg32	Ser96	Tyr102	Ile63		Val106
253.49	20.20	-7.07	-41.07		-61.45
Thr33	Leu97	Ser103	Thr64		
214.38	16.24	31.77	-111.55		
Leu34	Ser98	Gly105	Ser66		
101.45	35.95	7.80	-64.59		
Gly35			Phe80		
81.07			-148.06		
Ser38					
126.54					
Glu41					
132.92					
Gly71					
173.81					
Leu72					
89.25					
Met73					
126.10					
Asp75					
160.68					

Tabla 3.58: Residuos que han tenido algún contacto en la interacción *Phl p 7*-CDR, la cadena A es la *Phl p 7* y el CDR está formado por dos cadenas tanto la B como la C. Las energías en kJ/mol se encuentran debajo de cada residuo y resaltados en rojo son los que formaron un enlace de hidrógeno.

De acuerdo con la clasificación de enlaces de hidrógeno Jeffrey¹⁰⁴ y Frey¹⁰⁵, la solución 3 solo presentaría “enlaces de hidrógeno débil”. Los seis enlaces que se formaron superan los 2.6 Å, pero dos enlaces de hidrógeno se acercan mucho a ser un “enlace de hidrógeno de barrera baja”, LBHB, entre ellos está el enlace de hidrógeno entre Glu41 de la cadena A con Ser98 de la cadena B y Asp 75 de la cadena A con Ser103 de la cadena C. Las longitudes de sus enlaces son de 2.62 y 2,61 ángstrom respectivamente. En la solución 6 no se dio la formación de ningún enlace de hidrógeno con el CDR, como se muestra en la Tabla 3.59.

Enlaces de hidrógeno entre <i>Phl p 7</i> -CDR											
	N°	N.	N.	N°	C	N°	N.	N.	N°	C	
	ATM	ATM	Res.	Res.	a	ATM	ATM	Res.	Res.	a	Å
					e					n	
					a					a	
Sol 3	611	OE2	Glu	41	A -	2579	N	Ser	98	B	2.86
	611	OE2	Glu	41	A -	2586	OG	Ser	98	B	2.62
	477	N	Arg	32	A -	5929	O	Ser	103	C	2.88
	1046	O	Gly	71	A -	5877	N	Tyr	101	C	2.88
	1114	OD2	Asp	75	A -	5919	N	Ser	103	C	2.73
	1114	OD2	Asp	75	A -	5926	OG	Ser	103	C	2.61
Sol 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.59: Enlaces de hidrógeno formados entre *Phl p 7*-CDR. Se presenta número de átomo, nombre del átomo, nombre del residuo, número de residuo, la cadena a la que pertenece y la distancia entre cada átomo que formó el enlace de hidrógeno.

3.5.5. 97.3 °C - 370.45 K

Después de someter nuestras estructuras a un análisis de MM/PBSA, para la solución 9 y 10 se obtuvo una energía de unión bastante favorable, lo que nos da indicios de una reacción espontánea en las dos soluciones. La solución 10 obtuvo una menor energía de unión, ya que obtuvo -920.65 ± 65.34 kJ/mol y la solución 9 -696.974 ± 156.273 kJ/mol (Tabla 3.60). Si profundizamos en las energías que se toman en cuenta, se observa que las energías electrostáticas son más bajas que la energía de van der Waals, este patrón se repite en todas las anteriores soluciones a excepción de la solución 3 de la temperatura de 77.1 °C .

	Solución 9 (kJ/mol)	Solución 10 (kJ/mol)
Energía de van der Waals	-114.765 ± 15.566	-122.842 ± 14.528
Energía electrostática	-801.812 ± 170.954	-931.428 ± 52.857
Energía de solvatación polar	362.796 ± 52.457	259.378 ± 26.236
Energía SAV	-143.193 ± 22.501	-125.754 ± 26.394
Energía de unión	-696.974 ± 156.273	-920.646 ± 65.341

Tabla 3.60: Energía de unión (kJ/mol) de la solución 9 y 10, *Phl p 7* sometida a 97.3 °C.

En película de DM de la solución 9, la *Phl p 7* muestra estabilidad respecto a su posición inicial y como se muestra en la Figura 3.33 la separación entre ella y el CDR no es muy grande, además que mantiene contacto con las dos cadenas que integran el CDR.

En el caso de la solución 10, la película muestra poca conservación de unión entre *Phl p* 7-CDR, además pierde todo contacto con la cadena B.

Las energías obtenidas por MM/PBSA se visualizan en diferentes tonalidades para un análisis a grandes rasgos. En la solución 9 se ve la prevalencia de tonalidades azules sinónimo de más presencia de energías negativas igualmente que en la solución 10 (Figura 3.33).

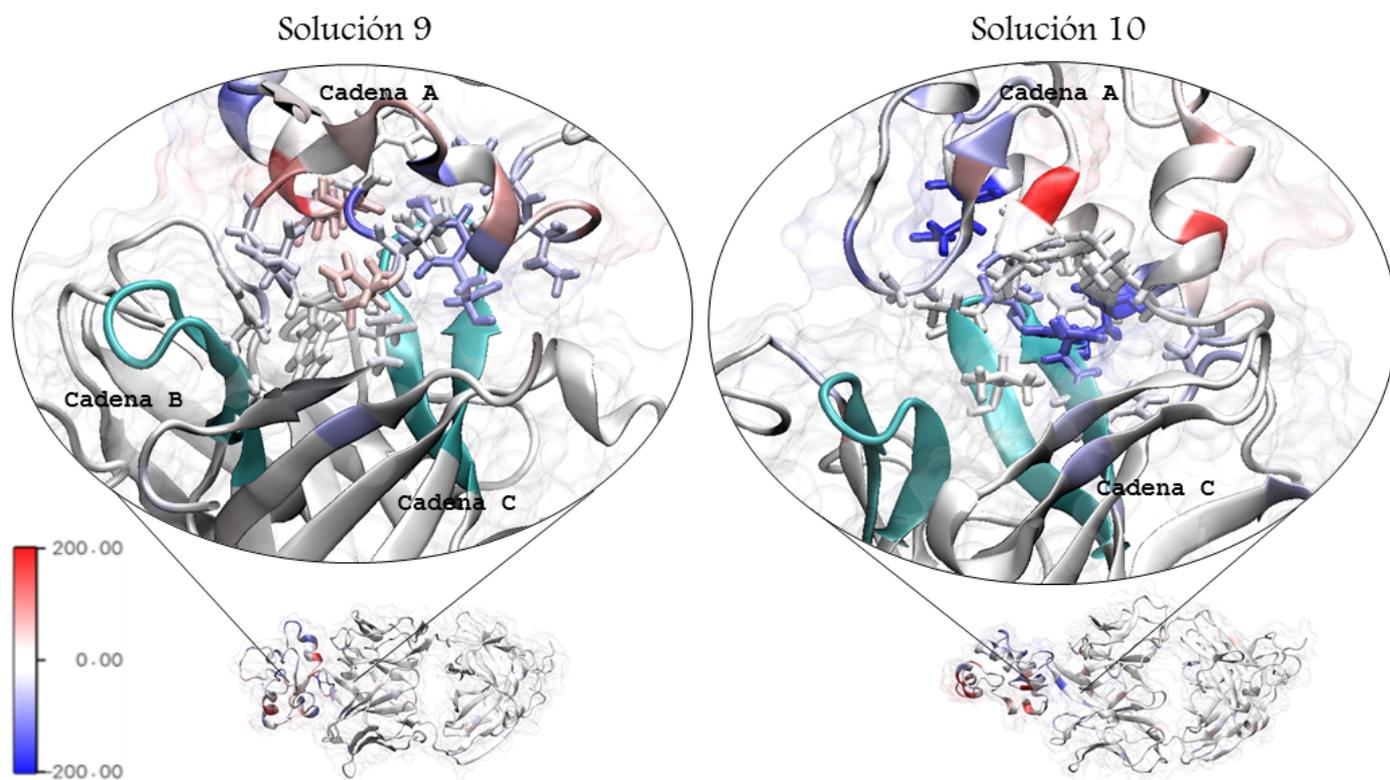


Figura 3.33: Visualización de la contribución de energía de cada residuo en la interacción *Phl p* 7-CDR en una escala de colores que va desde 200 a -200 kJ/mol según el valor de las energías.

Con PDBsum se obtuvo los contactos que se produjeron después de la DM. En la solución 9 se vio una disminución de la cantidad de enlaces de hidrógeno ya que pasó de tener 12 a tres. Las interacciones hidrofóbicas también se redujeron drásticamente de 237 a 79, pero se dio una conservación de los 2 puentes de sal entre *Phl p* 7-IgE, como se muestra en la Tabla 3.61. En el caso de la interacción *Phl p* 7-CDR, se dio la pérdida de enlaces de hidrógeno pasó de tener seis al inicio de la DM a solo tener dos. En el caso de las interacciones hidrofóbicas disminuyó de 104 a 39. Los contactos entre *Phl p* 7-CDR son muy pocos y casi pierde la conexión con la cadena B, solo fueron 16 interacciones hidrofóbicas que mantuvo.

Con respecto a la solución 10; si solo nos centramos en la interacción de *Phl p* 7-IgE,

se ve una pérdida de los contactos no enlazados de 218, pasó a 54. Con respecto a los enlaces de hidrógeno, pasó de tener cuatro a solo dos. Se ve la pérdida de interacciones hidrofóbicas entre *Phl p 7*-CDR, ya que pasó de 70 a tener solo 33. Aunque mantiene los dos enlaces de hidrógeno, solo son con la cadena C. Esta solución perdió cualquier tipo de contacto con la cadena B que integra el CDR (Tabla 3.62).

N°	Contactos entre <i>Phl p 7</i> -IgE					
	Cadena A-B			Cadena A-C		
	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces -H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 9	3	1	36	5	1	43
Sol 10	0	0	0	2	0	54

Tabla 3.61: Contactos entre *Phl p 7*-IgE después de la DM.

N°	Contactos entre <i>Phl p 7</i> -CDR					
	Cadena A - B			Cadena A - C		
	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas	Enlaces - H	Puentes de sal	Interacciones hidrofóbicas
Sol 9	0	0	16	2	0	23
Sol 10	0	0	0	2	0	33

Tabla 3.62: Contactos entre *Phl p 7*-CDR después de la DM.

Con LigPlot se obtuvo de forma gráfica los residuos que interactúan entre el complejo *Phl p 7*-CDR. En la solución 9; son nueve residuos de la cadena A que interactúan con el CDR, de estos dos han creado enlaces de hidrógeno (Arg 13 y Thr 33). En cuanto a la cadena B; se visualiza que Phe93 y Thr95 son los que interactúan con la cadena A, estos no generaron ningún enlace de hidrógeno pero poseen una energía negativa. En la cadena C, son cuatro los residuos que interactúan con la cadena A, Tyr101 y Ser103 fueron los que crearon enlaces de hidrógeno. De estos aminoácidos solo Ser103 presenta energía positiva, como se muestra en la Tabla 3.63.

En la solución 10, son ocho los residuos de la cadena A que interactúan con la cadena C del CDR, Glu41 creó un enlace de hidrógeno. En la cadena A todos los residuos presentan energías negativas. En la cadena C, son seis los residuos que interactúan con la cadena A, Ser103 fue el que creó un enlace de hidrógeno. En esta solución todos los residuos que interactúan presentan energías negativas.

Solución 9			Solución 10	
Cadena A	Cadena B	Cadena C	Cadena A	Cadena C
Arg13	Phe 93	Tyr101	Leu 34	Phe100
71.30	-25.99	-108.87	-27.69	-37.87
Phe14	Thr100	Ser103	Ser38	Tyr101
-20.65	-15.76	7.56	-59.90	-150.33
Thr16		Ser104	Glu41	Tyr102
-42.73		-14.84	-190.48	-30.55
Asn17		Ser106	Arg44	Ser103
64.91		-31.30	-1.69	-113.35
Gly18			Met45	Ser104
-21.59			-40.05	-20.25
Asp19			Glu48	Gly105
-48.10			-211.91	-20.12
Gly20			Gly71	
-39.45			-42.26	
Thr33			Val79	
-65.18			-9.37	
Leu34				
-65.51				

Tabla 3.63: Residuos que han tenido algún contacto en la interacción *Phl p 7*-CDR, la cadena A es la *Phl p 7* y el CDR está formado por dos cadenas tanto la B como la C. Las energías en kJ/mol se encuentran debajo de cada residuo y resaltados en rojo son los que formaron un enlace de hidrógeno.

Las dos soluciones solo presentan “enlace de hidrógeno débil”, ya que los cuatro enlaces que se formaron superan los 2.6 Å. En la solución 9, Ser103 y Tyr101 pertenecientes a la cadena C son los únicos residuos del CDR que crearon un enlace de hidrógeno con Arg13 y Thr33 de la *Phl p 7*. En la solución 10, Ser103 que pertenece al CDR es el que genera enlaces de hidrógeno con Glu41 de la *Phl p 7*. Como se muestra en la Tabla 3.64, no hay ninguna formación de enlaces de hidrógeno con la cadena B del CDR y la *Phl p 7*.

Enlaces de hidrógeno entre <i>Phl p 7</i> -CDR											
	N° ATM	N. ATM	N. Res.	N° Res.	C a d e n a	N° ATM	N. ATM	N. Res.	N° Res.	C a d e n a	Å
Sol 9	216	O	Arg	13	A -	5894	OH	Tyr	101	C	2.86
	514	O	Thr	33	A -	5926	OG	Ser	103	C	2.92
Sol 10	611	OE2	Glu	41	A -	5919	N	Ser	103	C	3.01
	611	OE2	Glu	41	A -	5926	OG	Ser	103	C	2.90

Tabla 3.64: Enlaces de hidrógeno formados entre *Phl p 7*-CDR. Se presenta número de átomo, nombre del átomo, nombre del residuo, número de residuo, la cadena a la que pertenece y la distancia entre cada átomo que formó el enlace de hidrógeno.

Raith et al. consideraron a la *Phl p 7* como un candidato para generar una variante hipoalergénica que podría usarse para inmunoterapia de individuos sensibilizados a pol-calicina¹². Al hacer una comparación entre la *Phl p 7* que estudiaron ellos y la *Phl p 7* de *Zea Mays* estudiada en este trabajo de investigación, al parecer la que se estudió posee una alta termoestabilidad en el rango de temperaturas en la que se realizó este estudio (17 °C - 97.3 °C), ya que conservó gran parte de su estructura secundaria y terciaria. Además, que poseía un número mayor de epítomos en comparación con la 2LVK, y aunque fue sometida a temperaturas elevadas se dieron varias interacciones entre la IgE y ésta, que puede ser interpretado como un reconocimiento. Esto sugiere una alta alergenicidad de la *Phl p 7* de *Zea Mays* aún sometida a condiciones desfavorables en temperatura.

Capítulo 4

Conclusiones

1. Se obtuvo la estructura terciaria de la *Phl p 7* específica de *Zea Mays* por el método de modelamiento por homología a partir de su secuencia de 80 residuos en formato fasta, obtenido en la base de datos NCBI. La estructura secundaria obtenida consta de cinco hélices α , cuatro giros β , un giro γ y dos dominios *EF-hand*. En el primer dominio (Asp15-Glu26), el Ca^{2+} generó cinco interacciones electrostáticas con los residuos Asp15, Asn17, Asp19, Lys21 y Glu26 a distancias entre 2.20 hasta 2.74 Å. En el segundo bucle (Asp50-Glu61), las interacciones generadas por el Ca^{2+} fueron con los residuos Asp50, Asp52, Asp54, Cys56 y Glu61 a distancias entre 2.20 hasta 2.70 Å. La estructura terciaria tuvo forma de barril en la que los bucles de coordinación de Ca^{2+} forman la parte superior del barril. Presentó un 83.1% en la región más favorecida del diagrama de Ramachandran, por lo que con ese porcentaje no llegó a ser una estructura de buena calidad.
2. A partir de la minimización se observó una mayor estabilidad estructural debida al acomodamiento de los átomos en la polcalcina. Este efecto de optimización se reflejó en una menor distancia bucle- Ca^{2+} y una diferente distribución en las interacciones, donde el primer bucle el Ca^{2+} generó cinco interacciones electrostáticas con el Asp15, Asp19, Lys21 y Glu26. En cambio en el segundo bucle el Ca^{2+} generó seis interacciones con los residuos Asp50, Asp52, Asp54, Cys56, Asp58 y Glu61. Esta diferencia, en comparación a la estructura de la polcalcina 2LVK, se debe a la presencia de una Cys en la posición 56 lo que le da una mayor afinidad al calcio. Esta estructura arrojó un RMSD de 0.228 Å con respecto a la estructura obtenida en el modelado por lo que se concluye que son estructuras muy estables. Al hacer el análisis de Ramachandran, la estructura presentó un 85.9% en la región más favorecida por lo que la minimización mejora el porcentaje. Además se debe considerar

- que los diagramas de Ramachandran no evalúan el efecto que puede tener el calcio en los valores de los ángulos ϕ - ψ de los residuos con los que interactúan.
3. Después de realizadas las DM a 500 ns se concluye que la temperatura no influye en gran medida en la estructura secundaria y terciaria, ya que la estructura sigue ligada al calcio reflejando unas conformaciones ordenadas y muy plegadas a altas temperaturas. El dominio *EF-hand* sigue conservándose en las diferentes temperaturas sin presentar cambios drásticos. A 77.3 °C fue donde se dio más pérdida de estructura terciaria y secundaria y a 17 °C fue donde más se preservó la estructura inicial.
 4. A pesar de la gran estabilidad mostrada por la polcalcina al cambio de temperatura, los análisis de los indicadores de estabilidad (RMSD, RMSF, RG, enlaces de hidrógeno) indican que a bajas temperaturas la estructura es más estable como es de esperarse. Sin embargo a temperatura corporal (37 °C) la polcalcina muestra una menor variación en estos indicadores.
 5. En el análisis de los acoplamientos moleculares se escogieron las dos mejores estructuras cuaternarias para cada temperatura obtenidas por los servidores PatchDock y FireDock. Estos 10 complejos moleculares presentaron valores para la energía global, área de interfaz y penetración bastantes óptimos para que se dé una interacción favorable en la unión antígeno-anticuerpo. Además todos los complejos presentaron un número elevado de enlaces de hidrógeno, puentes de sal y contactos no enlazados entre *Phl p 7*-CDR.
 6. Después de realizar la DM de 100 ns a 37 °C de las estructuras cuaternarias, se concluyó que el complejo antígeno-anticuerpo en su mayoría no mostró estabilidad de unión al CDR. Al hacer un análisis de los contactos después de la simulación, se visualiza que para la estructura de la polcalcina de la solución 2 obtenida a 17 °C y de la solución 3 obtenida a 77 °C, fueron las que crearon enlaces de hidrógeno con el CDR, lo que sugiere un acercamiento y estabilidad de unión con éste. La presencia de Arg, Thr, Glu y Gly en la *Phl p 7* al parecer contribuyen a la creación de contactos con las IgE, favoreciendo la unión estable de los complejos antígeno-anticuerpo.
 7. Los análisis de MM/PBSA mostraron en todas las estructuras cuaternarias energías de unión favorables, es decir, todas las posiciones adoptadas por la polcalcina en su interacción con la IgE eran energéticamente favorables para que se diera una unión espontánea. Aún así no se puede concluir que en todas las estructuras cuaternarias

se diera un reconocimiento por parte de la IgE, ya que muchas estructuras de la *Phl p 7* optaron por posiciones fuera del sitio de complementariedad.

En el presente trabajo de tesis se evaluó el efecto que tiene la temperatura en la estructura de la *Phl p 7* de *Zea Mays* en su forma aislada, y en su forma interactuante con la IgE usando métodos bioinformáticos. La *Phl p 7* mostró una alta termoestabilidad en el rango de temperaturas en la que se realizó este estudio (17 °C - 97.3 °C), ya que conservó gran parte de su estructura secundaria y terciaria además de los epítomos que fueron reconocidos por la IgE. Esto sugiere una alta alergenicidad de la *Phl p 7* aún sometida a condiciones desfavorables en temperatura. Es importante brindar la base de datos moleculares y resaltar los residuos que favorecen a un reconocimiento como la Arg, Thr, Glu y Gly; ya que esta polcalcina presenta una alta reactividad cruzada. Estos datos esperan contribuir a un mayor conocimiento de los antígenos relevantes para un diagnóstico, prevención y tratamiento de este tipo de alergias.

Recomendaciones

- Los resultados y conclusiones que se desprenden del presente trabajo de investigación teórico son orientados a crear una base de datos moleculares de la *Phl p 7* de *Zea Mays* ya que es un alérgeno poco estudiado, pero al parecer según los resultados posee una alta alergenicidad. Por lo tanto, se sugiere como próximo paso una corroboración experimental de los resultados teóricos obtenidos.
- Para resultados más representativos de la interacción *Phl p 7* de *Zea Mays* con la IgE, se recomienda aumentar el tiempo de las dinámicas moleculares de las estructuras cuaternarias hasta 500 ns. Además, aumentar el número de simulaciones para tener un análisis más completo de todos los epítomos de la polcalcina que interaccionan con la IgE.

Referencias Bibliográficas

1. Kay, A. *New England Journal of Medicine* **2001**, *344*, 30–37; PMID: 11136958.
2. Casolaro, V.; Georas, S. N.; Song, Z.; Ono, S. J. *Current Opinion in Immunology* **1996**, *8*, 796–803.
3. Jessica Salinas, L. *Revista Médica Clínica Las Condes* **2012**, *23*, 458–463.
4. Wopfner, N.; Dissertori, O.; Ferreira, F.; Lackner, P. *Immunology and Allergy Clinics of North America* **2007**, *27*, 29–44; Novel Aspects of Native and Recombinant Allergens and their Therapeutic Implications.
5. Niederberger, V.; Hayek, B.; Vrtala, S.; Laffer, S.; Twardosz, A.; Vangelista, L.; Sperr, W. R.; Valent, P.; Rumpold, H.; Kraft, D.; Ehrenberger, K.; Valenta, R.; Spitzauer, S. *The FASEB Journal* **1999**, *13*, 843–856.
6. Verdino, P.; Westritschnig, K.; Valenta, R.; Keller, W. *The EMBO journal* **2002**, *21*, 5007–16.
7. Westritschnig, K.; Focke-Tejkl, M.; Verdino, P.; Goessler, W.; Keller, W.; Twardosz, A.; Mari, A.; Horak, F.; Wiedermann, U.; Hartl, A.; Thalhamer, J.; Sperr, W.; Valent, P.; Valenta, R. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2004**, *172*, 5684–92.
8. Vrtala, S.; Grote, M.; Duchêne, M.; vanRee, R.; Kraft, D.; Scheiner, O.; Valenta, R. *International Archives of Allergy and Immunology* **1993**, *102*, 160–169.
9. Laffer, S.; Vangelista, L.; Steinberger, P.; Kraft, D.; Pastore, A.; Valenta, R. *The Journal of Immunology* **1996**, *157*, 4953–4962.
10. Tinghino, R.; Twardosz, A.; Barletta, B.; Puggioni, E. M.; Iacovacci, P.; Butteroni, C.; Afferni, C.; Mari, A.; Hayek, B.; Di Felice, G.; Focke, M.; Westritschnig, K.; Valenta, R.; Pini, C. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2002**, *109*, 314–320.

11. Valenta, R.; Hayek, B.; Seiberler, S.; Bugajska-Schretter, A.; Niederberger, V.; Twardosz, A.; Natter, S.; Vangelista, L.; Pastore, A.; Spitzauer, S.; Kraft, D. *International Archives of Allergy and Immunology* **1998**, *117*, 160–166.
12. Raith, M.; et al. *Scientific reports* **2019**, *9*, 7802–7802; 31127132[pmid].
13. Blum, H. E.; Lehky, P.; Kohler, L.; Stein, E. A.; Fischer, E. H. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 2834–2838.
14. Johansson, S. G. O.; Hourihane, J.; Bousquet, J.; Bruijnzeel-Koomen, C.; Dreborg, S.; Haahtela, T.; Kowalski, M. L.; Mygind, N.; Ring, J.; Van Cauwenberge, P.; Van Hage-Hamsten, M.; Wüthrich, B. *Allergy* **2001**, *56*, 813–824.
15. Johansson, S.; Bieber, T.; Dahl, R.; Friedmann, P. S.; Lanier, B. Q.; Lockey, R. F.; Motala, C.; Ortega Martell, J. A.; Platts-Mills, T. A.; Ring, J.; Thien, F.; Van Cauwenberge, P.; Williams, H. C. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2004**, *113*, 832 – 836.
16. Gell, P. G. H.; Coombs, R. R. A. *Clinical Aspects of Immunology*; Gell, P. G. H.; Coombs, R. R. A., Eds.; Blackwell Scientific Publications Ltd.: 24-25, Broad Street, Oxford, UK, 1963.
17. Stone, K. D.; Prussin, C.; Metcalfe, D. D. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2010**, *125*, S73–S80.
18. Gonzalez, L. *Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES* **2014**, *1*, 43.
19. Williams, A. F.; Barclay, A. N. *Annual Review of Immunology* **1988**, *6*, 381–405; PMID: 3289571.
20. Godwin L, C. J., Sinawe H *Crane JS. Biochemistry* **2020**.
21. Oettgen, H. C. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2016**, *137*, 1631–1645.
22. freepng.es/; <https://www.freepng.es/png-l4wi86/r>; 22 de Marzo de 2021.
23. Aalberse, R. C. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2000**, *106*, 228 – 238.
24. Pomés A, I. D. e., Villalba M. Alérgenos. En: A. Peláez *Tratado de Alergología. Sociedad Española de Alergología*; Sociedad Española de Alergología, 2007; pp 3–26.
25. Valero, A.; Picado, C. *Polinosis*; MRA ediciones, 2002.

26. Valero, A.; A, C. *Polinosis II*; MRA ediciones, 2005.
27. Sibbald, B.; Rink, E. *Thorax* **1991**, *46*, 378–381.
28. Bluestone, C. D. *Journal of allergy and clinical immunology* **1983**, *72*, 242–251.
29. Ruiz, F.; Vega-Briceño, L.; Vargas, R.; Garcia, A.; Shion, D.; Caravedo, L.; Chiarella, P. *Revista Medica Herediana* **1997**, *8*, 108–111.
30. Crystal-Peters, J.; Neslusan, C.; Crown, W. H.; Torres, A. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2002**, *109*, 57–62.
31. Togias, A. G. *Journal of allergy and clinical immunology* **2000**, *106*, S247–S250.
32. Perez Lu, J. E.; Centeno Huaman, J.; Chiarella Ortigoza, P.; Perez Lu, L. E.; Sialer Chavez, S. T. *Revista Medica Herediana* **2003**, *14*, 111–116.
33. García-Gomero, D.; López-Talledo, M. d. C.; Galván-Calle, C.; Muñoz-León, R.; Matos-Benavides, E.; Toribio-Dionicio, C.; Córdova-Calderón, W. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* **2020**, *37*, 57–62.
34. SOTO, V. V. H.; *FACTORES SOCIODEMOGRÁFICOS ASOCIADOS AL MAL CONTROL DE LA RINITIS ALÉRGICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DEL PROGRAMA DE ASMA DEL HOSPITAL III YANAHUARA-ESSALUD*; 2021.
35. EsSalud; <http://noticias.essalud.gob.pe/?inno-noticia=essalud-explica-como-reconocer-una-alergia-primaveral-en-tiempos-de-pandemia>; 30 de setiembre del 2020.
36. Suárez-Cervera M, S.-C. J. *Biología celular del polen: origen y función de los alérgenos polínicos*; MRA ediciones, 2004.
37. Behrendt, H.; Becker, W.-M. *Current Opinion in Immunology* **2001**, *13*, 709–715.
38. Behrendt, H.; Tomczok, J.; Sliwa-Tomczok, W.; Kasche, A.; Ebner von Eschenbach, C.; Becker, W. M.; Ring, J. *International Archives of Allergy and Immunology* **1999**, *118*, 414–418.
39. Verdino, P. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **2006**, *30*, 73–95.
40. Casas, A. P.; Tesis doctoral; Departament de Medicina; 2012.
41. Popescu, F.-D. *World journal of methodology* **2015**, *5 2*, 31–50.

42. Ferreira, F.; Hawranek, T.; Gruber, P.; Wopfner, N.; Mari, A. *Allergy* **2004**, *59*, 243–267.
43. Fernandes, J.; Reshef, A.; Patton, L.; Ayuso, R.; Reese, G.; Lehrer, S. B. *Clinical & Experimental Allergy* **2003**, *33*, 956–961.
44. Aalberse, R. C.; Akkerdaas, J.; Van Ree, R. *Allergy* **2001**, *56*, 478–490.
45. Hauser, M.; Roulias, A.; Ferreira, F.; Egger, M. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **2010**, *6*, 1.
46. Mari, A. *International archives of allergy and immunology* **2001**, *125*, 57–65.
47. Aas, K.; Jebsen, J. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **1967**, 1–20.
48. Coffee, C.; Bradshaw, R. *J Biol Chem* **1973**, 3302.
49. Bugajska-Schretter, A.; Grote, M.; Vangelista, L.; Valent, P.; Sperr, W.; Rumpold, H.; Pastore, A.; Reichelt, R.; Valenta, R.; Spitzauer, S. *Gut* **2000**, *46*, 661–669.
50. Henzl, M.; Davis, M.; Tan, A. *Biochemistry* **2010**, *49*, 2256–68.
51. Henzl, M. T.; Sirianni, A. G.; Wycoff, W. G.; Tan, A.; Tanner, J. J. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2013**, *81*, 300–315.
52. Pace, C. N.; Fu, H.; Fryar, K. L.; Landua, J.; Trevino, S. R.; Shirley, B. A.; Hendricks, M. M.; Iimura, S.; Gajiwala, K.; Scholtz, J. M.; Grimsley, G. R. *Journal of Molecular Biology* **2011**, *408*, 514–528.
53. Rathore, K. S.; Cork, R.; Robinson, K. R. *Developmental Biology* **1991**, *148*, 612–619.
54. D. Miller, D.; A. Callaham, D.; J. Gross, D.; Hepler, P. *Journal of Cell Science* **1992**, *101*.
55. Pierson, E.; Miller, D.; Callaham, D.; van Aken, J.; Hackett, G.; Hepler, P. *Developmental Biology* **1996**, *174*, 160–173.
56. Messerli, M.; Robinson, K. *Journal of cell science* **1997**, *110 (Pt 11)*, 1269–78.
57. Niederberger, V.; HAYEK, B.; VRTALA, S.; LAFFER, S.; TWARDOSZ, A.; Vangelista, L.; R. SPERR, W.; VALENT, P.; Rumpold, H.; KRAFT, D.; EHRENBERGER, K.; VALENTA, R.; SPITZAUER, S. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1999**, *13*, 843–56.

58. Fort, A.; Boucher, S.; Cortez, R.; Riesco, G. *La Pequeña Agricultura Piurana*; CUP, 2001.
59. Huamanchumo de la Cuba, C.; *La cadena de valor de maíz en el Perú diagnóstico del estado actual, tendencias y perspectivas.*; Tech. Rep.; IICA, Lima (Perú); 2013.
60. Lushington, G. H. In *Molecular Modeling of Proteins*; Springer, 2015; pp 309–330.
61. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235–242.
62. Sebastián Yagüe, Á.; Pascual-García, A.; Abascal, F.; Aguirre, J.; Bajic, D.; Baú, D.; Bueren-Calabuig, J. A.; Cortés Cabrera, Á.; Dotu, I.; Fernández, J. M.; et al. In *"Bioinformática con Ñ v1. 0": a collaborative project of young Spanish scientists to write a complete book about Bioinformatics*, 2014; p 206.
63. Schrödinger, L.; DeLano, W.; *PyMOL*. <http://www.pymol.org/pymol>.
64. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *Journal of Molecular Graphics* **1996**, *14*, 33–38.
65. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605–1612.
66. Johansson, M. U.; Zoete, V.; Michielin, O.; Guex, N. *BMC bioinformatics* **2012**, *13*, 1–11.
67. *Jmol: un visor Java de código abierto para estructuras químicas en 3D*. <http://www.jmol.org/>.
68. Sayle, R. A.; Milner-White, E. J. *Trends in biochemical sciences* **1995**, *20*, 374–376.
69. Sebastián Yagüe, Á.; Pascual-García, A.; Abascal, F.; Aguirre, J.; Bajic, D.; Baú, D.; Bueren-Calabuig, J. A.; Cortés Cabrera, Á.; Dotu, I.; Fernández, J. M.; et al. In *Bioinformática con Ñ v1. 0: a collaborative project of young Spanish scientists to write a complete book about Bioinformatics*, 2014; pp 425–442.
70. Cramer, C.; *Computational Chemistry: Theories and Models*; 2004.
71. Leach, A. R.; Leach, A. R. *Molecular modelling: principles and applications*; Pearson education, 2001.

72. Chandler, D. *Mechanics*. Oxford University Press, Oxford, UK **1987**, 40.
73. Lushington, G. H. In *Molecular Modeling of Proteins*; Springer, 2015; pp 3–26.
74. Williams, D. H.; Stephens, E.; O'Brien, D. P.; Zhou, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 6596–6616.
75. Sebastián Yagüe, Á.; Pascual-García, A.; Abascal, F.; Aguirre, J.; Bajic, D.; Baú, D.; Bueren-Calabuig, J. A.; Cortés Cabrera, Á.; Dotu, I.; Fernández, J. M.; et al. In *Bioinformática con Ñ v1. 0: a collaborative project of young Spanish scientists to write a complete book about Bioinformatics*, 2014; pp 401–423.
76. Genheden, S.; Ryde, U. *Expert opinion on drug discovery* **2015**, *10*, 449–461.
77. Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; et al. *Accounts of chemical research* **2000**, *33*, 889–897.
78. Kumari, R.; Kumar, R.; Consortium, O. S. D. D.; Lynn, A. *Journal of chemical information and modeling* **2014**, *54*, 1951–1962.
79. O'Leary, N. A.; et al. *Nucleic Acids Research* **2015**, *44*, D733–D745.
80. Consortium, T. U. *Nucleic Acids Research* **2020**, *49*, D480–D489.
81. Berendsen, H.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. *Computer Physics Communications* **1995**, *91*, 43–56.
82. Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. *Molecular modeling annual* **2001**, *7*, 306–317.
83. Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1701–1718.
84. Gijs Schaftenaar; *Molden*. <https://www3.cmbi.umcn.nl/molden/>.
85. Laskowski, R. A.; Swindells, M. B. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, *51*, 2778–2786.
86. Simon Tatham; *PuTTY*. <https://www.putty.org/>.
87. Boze, A. *Information Technology and Libraries* **2002**, *21*, 190–192.
88. *ConTEXT*. <https://www.contexteditor.org/index.php>.

89. Jurrus, E.; Engel, D.; Star, K.; Monson, K.; Brandi, J.; Felberg, L. E.; Brookes, D. H.; Wilson, L.; Chen, J.; Liles, K.; et al. *Protein Science* **2018**, *27*, 112–128.
90. Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. *Nature Methods* **2015**, *12*, 7–8.
91. Laskowski, R. A.; Jabłońska, J.; Pravda, L.; Vařeková, R. S.; Thornton, J. M. *Protein science* **2018**, *27*, 129–134.
92. Wiederstein, M.; Sippl, M. J. *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*, W407–W410.
93. Ponomarenko, J.; Bui, H.-H.; Li, W.; Fusseder, N.; Bourne, P. E.; Sette, A.; Peters, B. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 514.
94. Duhovny, D.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J. In *Algorithms in Bioinformatics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; pp 185–200.
95. Schneidman-Duhovny, D.; Inbar, Y.; Polak, V.; Shatsky, M.; Halperin, I.; Benyamini, H.; Barzilai, A.; Dror, O.; Haspel, N.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2003**, *52*, 107–112.
96. Schneidman-Duhovny, D.; Inbar, Y.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J. *Nucleic Acids Research* **2005**, *33*, W363–W367.
97. Andrusier, N.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, *69*, 139–159.
98. Mashiach, E.; Schneidman-Duhovny, D.; Andrusier, N.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J. *Nucleic Acids Research* **2008**, *36*, W229–W232.
99. Mitropoulou, A. N.; Bowen, H.; Dodev, T. S.; Davies, A. M.; Bax, H. J.; Beavil, R. L.; Beavil, A. J.; Gould, H. J.; James, L. K.; Sutton, B. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, *115*, E8707–E8716.
100. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*; Garland Science, 2002.
101. Andrusier, N.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, *69*, 139–159.
102. Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. *Molecular biology of the gene*, 2008.

103. Reverberi, R.; Reverberi, L. *Blood transfusion* **2007**, 5, 227.
104. Jeffrey, G. A.; Jeffrey, G. A. *An introduction to hydrogen bonding*; Oxford university press New York, 1997; Vol. 12.
105. Kohen, A.; Limbach, H.-H. *Isotope effects in chemistry and biology*; cRc Press, 2005.





Apéndice A

Primer apéndice

A.1. Metodología

```
PROGRAM editconf
IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
parameter(maxnat=1000000)
parameter(maxn=100000)
real*8 num,coorx(maxn),coory(maxn),coorz(maxn)
real*8 coorxn(maxn),cooryn(maxn),coorz n(maxn)
real*8 mayx,mensex,mayy,meny,mayz,menz,centx,centy,centz
character*72 line
character*20 lin1(maxn)
integer numat
```

!
!

ARCHIVOS USADOS

```
write(6,*)'¿A qué distancia estará de los bordes?'
read(5,*)num
open(11,file='sol_2.ref.gro')
rewind 11
open(12,file='sol_2.box.gro')
rewind 12

menx=20.0
mayx=0.0
meny=20.0
mayy=0.0
menz=20.0
mayz=0.0
read(11,*)line
write(12,*)line
read(11,20)numat
write(12,20)numat
```

```
!      BÚSQUEDA DE LAS COORDENADAS MAYORES Y MENORES EN X,Y,Z
do i=1,numat
  read(11,21) lin1(i),coorx(i),coory(i),coorz(i)
  if (coorx(i).le.menx) then
    menx=coorx(i)
  endif
  if (coorx(i).ge.mayx) then
    mayx=coorx(i)
  endif

  if (coory(i).le.meny) then
    meny=coory(i)
  endif
  if (coory(i).ge.mayy) then
    mayy=coory(i)
  endif

  if (coorz(i).le.menz) then
    menz=coorz(i)
  endif
  if (coorz(i).ge.mayz) then
    mayz=coorz(i)
  endif
enddo

c      write(6,22)'el valor de ACE es: ',coorx(num)
write(6,22)'El valor mÃ¡-nimo en x es: ',menx
write(6,22)'El valor mÃ¡;ximo en x es: ',mayx
write(6,22)'El valor mÃ¡-nimo en y es: ',meny
write(6,22)'El valor mÃ¡;ximo en y es: ',mayy
write(6,22)'El valor mÃ¡-nimo en z es: ',menz
write(6,22)'El valor mÃ¡;ximo en z es: ',mayz
```



```
boxx=(mayx-menx)+num*2
boxy=(mayy-meny)+num*2
boxz=(mayz-menz)+num*2

write(6,23)'La caja deberá tener como dimensiones:'
write(6,24)boxx,boxy,boxz

!
!-----
!      COSTRUCCIÓN DEL NUEVO SISTEMA DE COORDENADAS X,Y,Z
!
!      Coordenadas del centro del nuevo sistema de coordenadas
centx=menx-num
centy=meny-num
centz=menz-num

do i=1,numat
  coorxn(i)=coorx(i)-centx
  cooryn(i)=coory(i)-centy
  coorz(i)=coorz(i)-centz
  write(12,21)lin1(i),coorxn(i),cooryn(i),coorz(i)
enddo
write(12,24)boxx,boxy,boxz

20  format(i8)
21  format(a20,3f8.3)
22  format(a25,f8.3)
23  format(a40)
24  format(3f10.5)

return
end
```

Figura A.1: Programa para ajustar la caja utilizada a un tamaño deseado, tomando las coordenadas mayores en X, Y y Z

```

#Complex Number: 1
=====
SUMMARY
=====

van der Waal energy      =      -334.587  +/-  15.514 kJ/mol

Electrostatic energy     =      -159.380  +/-  15.810 kJ/mol

Polar solvation energy   =       313.698  +/-  10.174 kJ/mol

SASA energy              =       -30.431  +/-   0.996 kJ/mol

SAV energy                =         0.000  +/-   0.000 kJ/mol

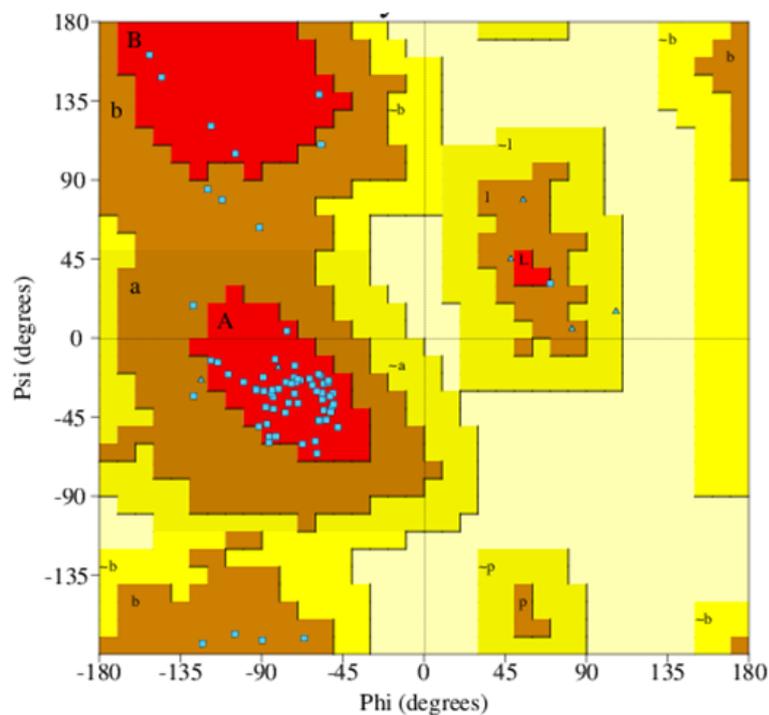
WCA energy                =         0.000  +/-   0.000 kJ/mol

Binding energy           =      -210.699  +/-  19.745 kJ/mol

=====
END
=====
    
```

Figura A.2: Componentes energéticos, incluida la energía de enlace con sus respectivas desviaciones promedio

A.2. Modelamiento por homología



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	59	83.1%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	12	16.9%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
<hr/>		
Number of non-glycine and non-proline residues	71	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	6	
Number of proline residues	1	
<hr/>		
Total number of residues	82	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura A.3: Ramachandran. Cada punto representa un residuo, la región (A, a y ~a) representa la hélice alfa con giro a la derecha que se visualiza de color rojo, la región (B, b y ~b) representa la hoja beta que se visualiza de un color marrón y finalmente la región (L, l y ~l) representa la hélice alfa con giro a la izquierda que se visualiza de color amarillo. Imagen obtenida de PDBsum

Z-Score: **-7.02**

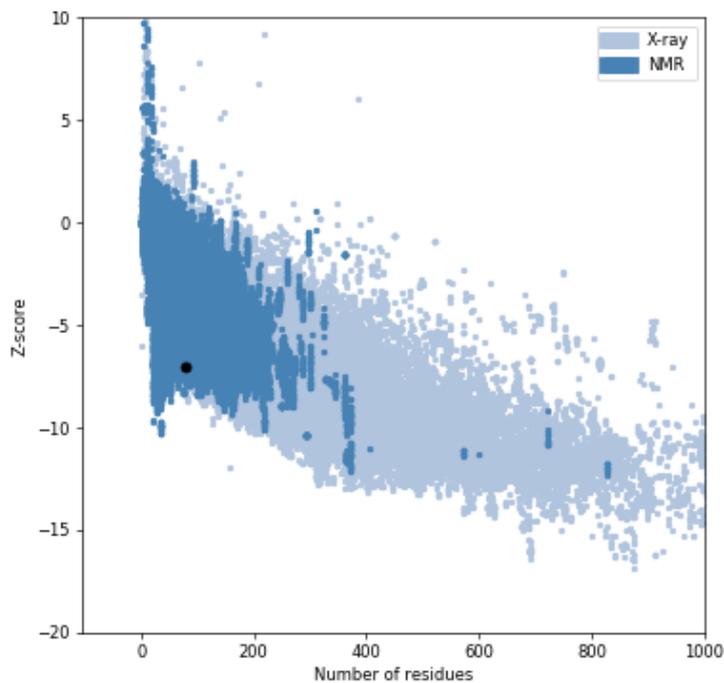


Figura A.4: Puntuación Z.

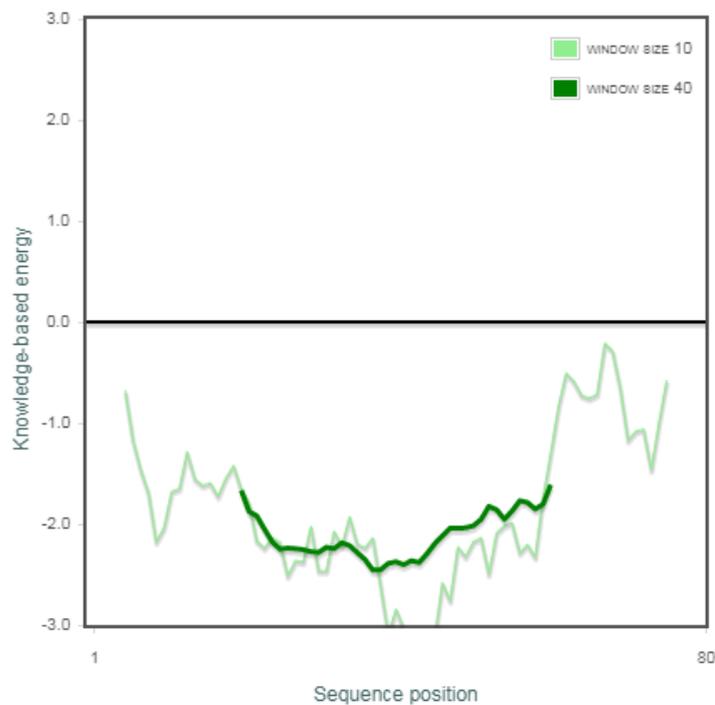
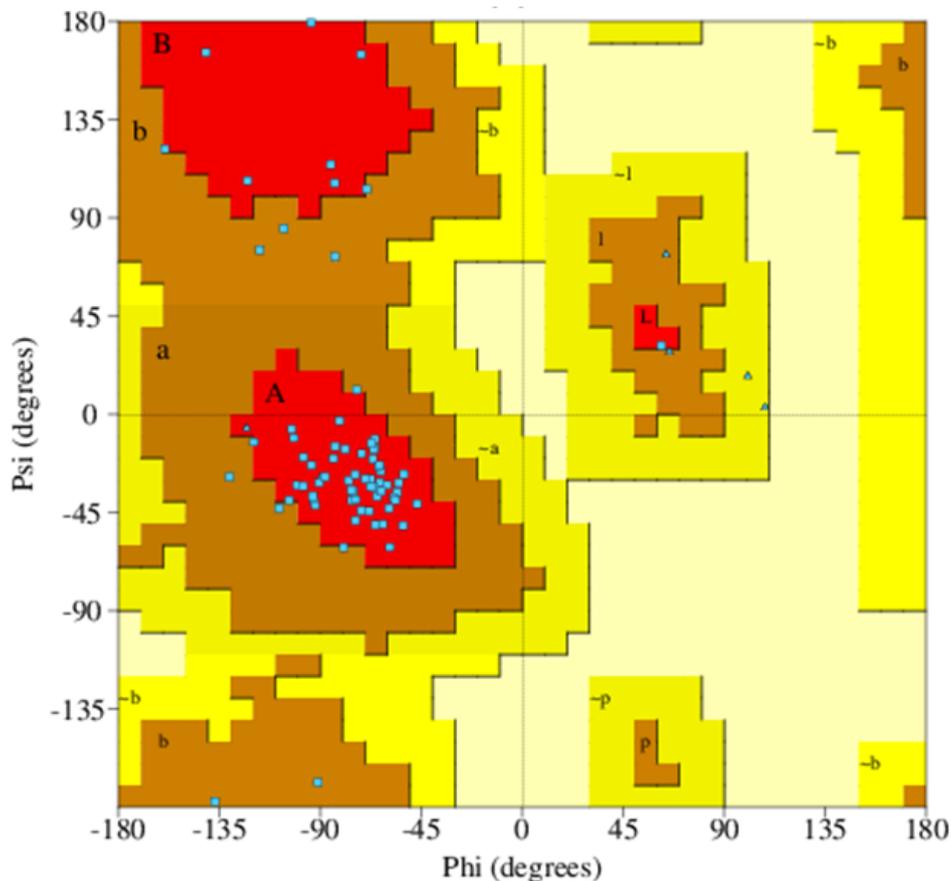


Figura A.5: Gráfico de puntuación de residuos.



A.3. Minimización de la estructura por el método de *Stept Descent*



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	61	85.9%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	10	14.1%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	71	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	6	
Number of proline residues	1	

Total number of residues	82	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura A.6: Ramachandran. Cada punto representa un residuo, la región (A, a y ~a) representa la hélice alfa con giro a la derecha, que se visualiza de color rojo, la región (B, b y ~b) representa la hoja beta, que se visualiza de un color marrón y finalmente la región (L, l y ~l) representa la hélice alfa con giro a la izquierda, que se visualiza de color amarillo. Imagen obtenida de PDBsum

Z-Score: **-6.82**

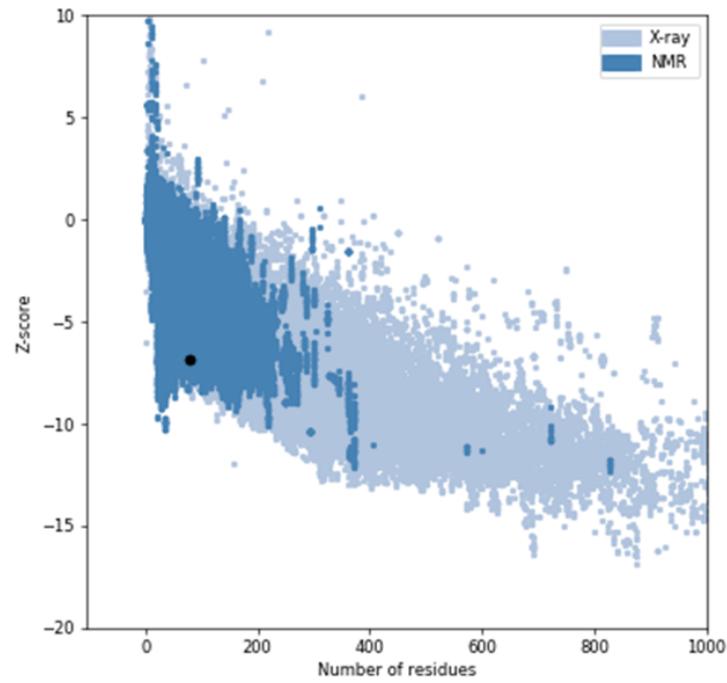


Figura A.7: Puntuación Z.

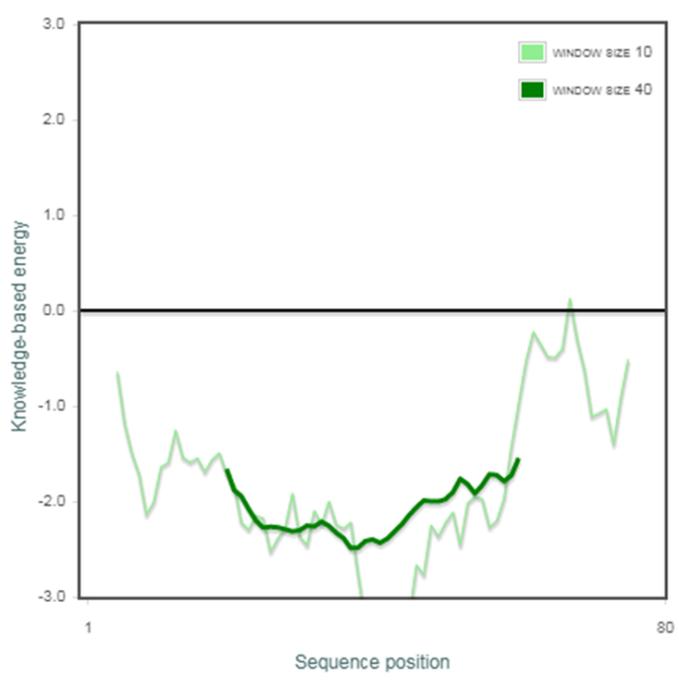


Figura A.8: Gráfico de puntuación de residuos.

A.4. Dinámica molecular de la estructura terciaria

A.4.1. Dominio *EF-hand*

		Distancia del calcio con los residuos con los que interacciona 1 ^{er} Bucle				
Residuos	Nº del residuo	17 °C-290.15 K	37 °C-310.15 K	57.9 °C-331.05 K	77.3 °C-350.45 K	97.3 °C-370.45 K
Ácido aspártico	15	0.226 ± 0.006	0.228 ± 0.006	0.226 ± 0.006	0.226 ± 0.007	0.227 ± 0.006
Treonina	16	0.362 ± 0.019	0.392 ± 0.071	0.457 ± 0.089	0.384 ± 0.063	0.412 ± 0.075
Asparagina	17	0.360 ± 0.086	0.377 ± 0.094	0.382 ± 0.077	0.406 ± 0.079	0.352 ± 0.091
Glicina	18	0.421 ± 0.027	0.415 ± 0.038	0.419 ± 0.043	0.429 ± 0.042	0.417 ± 0.048
Ácido aspártico	19	0.224 ± 0.005	0.225 ± 0.005	0.227 ± 0.006	0.225 ± 0.006	0.226 ± 0.006
Glicina	20	0.447 ± 0.033	0.430 ± 0.047	0.426 ± 0.036	0.431 ± 0.041	0.414 ± 0.051
Lisina	21	0.244 ± 0.011	0.243 ± 0.017	0.238 ± 0.009	0.242 ± 0.013	0.249 ± 0.036
Isoleucina	22	0.359 ± 0.028	0.359 ± 0.027	0.370 ± 0.026	0.363 ± 0.027	0.367 ± 0.029
Serina	23	0.372 ± 0.023	0.419 ± 0.070	0.377 ± 0.027	0.381 ± 0.036	0.442 ± 0.083
Leucina	24	0.779 ± 0.023	0.829 ± 0.067	0.782 ± 0.026	0.790 ± 0.037	0.846 ± 0.074
Serina	25	0.718 ± 0.051	0.772 ± 0.064	0.729 ± 0.049	0.739 ± 0.064	0.786 ± 0.072
Ácido glutámico	26	0.231 ± 0.005	0.231 ± 0.006	0.229 ± 0.006	0.230 ± 0.006	0.230 ± 0.006

Tabla A.1: Distancias entre los residuos que conforman el primer bucle y el calcio.

Distancia del calcio con los residuos con los que interacciona 2 ^{do} Bucle						
Residuos	N° del residuo	17 °C-290.15 K	37 °C-310.15 K	57.9 °C-331.05 K	77.3 °C-350.45 K	97.3 °C-370.45 K
Ácido aspártico	50	0.224 ± 0.005	0.224 ± 0.005	0.225 ± 0.006	0.224 ± 0.006	0.225 ± 0.006
Treonina	51	0.377 ± 0.026	0.376 ± 0.025	0.381 ± 0.026	0.377 ± 0.027	0.382 ± 0.028
Ácido aspártico	52	0.224 ± 0.005	0.225 ± 0.006	0.225 ± 0.006	0.225 ± 0.006	0.225 ± 0.006
Glicina	53	0.377 ± 0.031	0.430 ± 0.048	0.409 ± 0.047	0.413 ± 0.047	0.396 ± 0.039
Ácido aspártico	54	0.227 ± 0.006	0.227 ± 0.006	0.227 ± 0.006	0.227 ± 0.006	0.227 ± 0.006
Glicina	55	0.397 ± 0.034	0.413 ± 0.041	0.399 ± 0.042	0.408 ± 0.041	0.395 ± 0.040
Cisteina	56	0.240 ± 0.009	0.243 ± 0.009	0.244 ± 0.011	0.244 ± 0.011	0.242 ± 0.011
Isoleucina	57	0.396 ± 0.015	0.402 ± 0.016	0.401 ± 0.017	0.399 ± 0.017	0.402 ± 0.018
Ácido aspártico	58	0.227 ± 0.006	0.227 ± 0.006	0.227 ± 0.006	0.227 ± 0.006	0.227 ± 0.007
Fenilalanina	59	0.706 ± 0.012	0.696 ± 0.016	0.702 ± 0.015	0.700 ± 0.015	0.700 ± 0.016
Asparagina	60	0.666 ± 0.076	0.651 ± 0.096	0.616 ± 0.086	0.587 ± 0.062	0.625 ± 0.093
Ácido glutámico	61	0.229 ± 0.006	0.230 ± 0.006	0.230 ± 0.006	0.229 ± 0.006	0.229 ± 0.007

Tabla A.2: Distancias entre los residuos que conforman el segundo bucle y el calcio.