

**Universidad Católica de Santa María**

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y  
Biotecnológicas**

**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**DETERMINACIÓN MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR DE LA INFLUENCIA  
DEL PH EN LA POLCALCINA JUN O 2 PRESENTE EN ZEA MAYS (MAÍZ)  
RESPECTO A SU FORMA AISLADA E INTERACTUANTE CON LA  
INMUNOGLOBULINA E.**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Bellido Vallejo, Karen Lizeth**

para optar el Título Profesional de

**Ingeniera Biotecnóloga**

Asesor:

**Dr. Gómez Valdez, Badhin**

**Arequipa – Perú**

**2021**

UCSM-ERP

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

Arequipa, 05 de Noviembre del 2021

**Dictamen: 005324-C-EPIB-2021**

Visto el borrador del expediente 005324, presentado por:

**2013248192 - BELLIDO VALLEJO KAREN LIZETH**

Titulado:

**DETERMINACIÓN MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR DE LA INFLUENCIA DEL PH EN LA  
POLCALCINA JUN O 2 PRESENTE EN ZEA MAYS (MAÍZ) RESPECTO A SU FORMA AISLADA E  
INTERACTUANTE CON LA INMUNOGLOBULINA E.**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**2346 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS**  
**DICTAMINADOR**



**2781 - BARREDA DEL CARPIO JAIME ERNESTO**  
**DICTAMINADOR**



**3060 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL**  
**DICTAMINADOR**

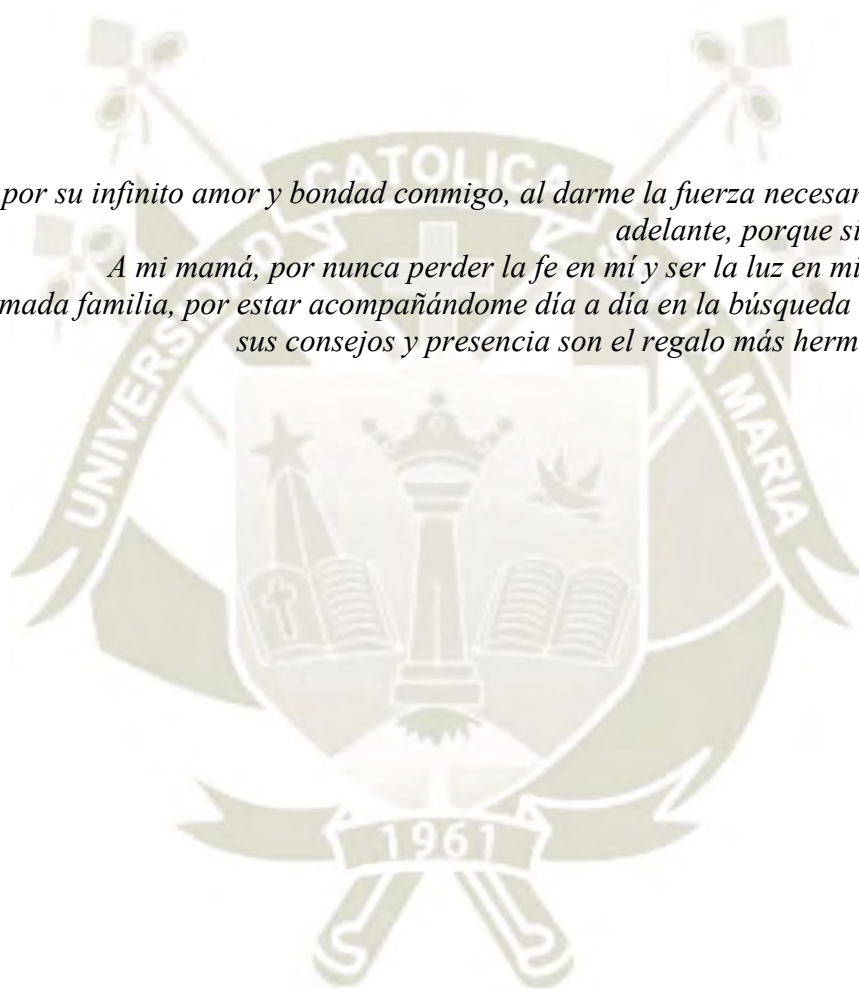


## DEDICATORIA

*A Dios, por su infinito amor y bondad conmigo, al darme la fuerza necesaria para seguir adelante, porque sin Él nada soy.*

*A mi mamá, por nunca perder la fe en mí y ser la luz en mi vida, gracias.*

*A mi amada familia, por estar acompañándome día a día en la búsqueda de mis sueños, sus consejos y presencia son el regalo más hermoso que tengo.*



## AGRADECIMIENTO

*Al concluir esta etapa maravillosa de vida quiero extender un profundo agradecimiento, a quienes hicieron posible lograr esta meta.*

*Al Dr. Badhin Gómez, gracias por proveerme esperanza en el área de la investigación. Ya que, por su apoyo y confianza desde el primer día, me permitió formar parte de éste gran equipo de trabajo, ya que usted nos impulsa a amar la investigación, nos da grandes consejos y ejemplo para buscar la mejora continua.*

*Al Dr. Jorge Aguilar, gracias por tu paciencia y sus virtudes, por compartir sus conocimientos de manera generosa e invaluable, por su dedicación perseverancia y tolerancia. Sus consejos fueron siempre útiles cuando no salían de mi pensamiento las ideas para escribir lo que hoy he logrado. Usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan. Muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento, cuando más las necesite, donde quiera que vaya, los llevaré conmigo en mí transitar. Su semilla de conocimientos, germinó en la historia de mi aprendizaje.*

*A Flor por ser una gran amiga y confidente, por su invaluable tiempo y paciencia. Cada día con su fortaleza, me incentivo para seguir adelante con mi tesis. Juntas empezamos la travesía en la búsqueda de nuestros sueños, compartiendo momentos llenos de retos para lograr las metas que deseábamos alcanzar.*

*También agradecer al gran equipo que forma parte del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular (CIIM), mis amigos queridos que con su guía llena de experiencia, su colaboración, sus consejos y su paciencia, me ayudaron para lograr los objetivos de mi tesis. Estoy muy agradecida por las experiencias vividas con cada uno de ustedes.*



## GLOSARIO

1. **ACE** = Energía atómica de contacto (*Atomic contact energy*).
2. **Alérgeno** = Sustancia que produce alergia.
3. **Atopia** = Reacción inmunológica patológica de tipo alérgico por acción de anticuerpos sobre las células; tiene un componente hereditario importante y sus manifestaciones son asma, rinitis alérgica, etc.
4. **CBP** = Proteína unida al calcio (*Calcium - binding protein*).
5. **CDR** = Región determinante de complementariedad (*Complementarity - determining - regions*).
6. **C-Score** = Puntaje de confianza para estimar los modelos predichos por el servidor I-TASSER.
7. **Cε2,3,4** = Dominios de la cadena pesada de la IgE.
8. **Epítopo** = Zona del alérgeno que es reconocida por los receptores del antígeno.
9. **Fab** = Fragmento del anticuerpo que se une al antígeno (*Fragment antigen - binding*).
10. **Fc** = Fragmento cristizable, contribuye a la activación de células fagocitas.
11. **FcεRI** = Receptor de alta afinidad para IgE. Es el responsable de la activación de las células cebadas y basófilos que intervienen en la respuesta alérgica.
12. **Formato fasta** = En bioinformática, es una representación de las secuencias de nucleótidos o amino ácidos mediante códigos que emplean letras.
13. **FAO** = La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ONUAA o más conocida como FAO, por sus siglas en inglés *Food and Agriculture Organization*.
14. **ISAAC** = Estudio internacional de asma y alergias en la infancia (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*)
15. **IUIS** = Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (*International Union of Immunological Societies*).
16. **MM-PBSA** = Mecánica molecular - Área superficial de Poisson-Boltzmann (*Molecular mechanics - Poisson-Boltzmann surface area*).
17. **NVT** = Ensamble estadístico canónico en el cual se mantienen constantes el número de átomos (N), el volumen (V) y la temperatura (T).
18. **NPT** = Ensamble estadístico isotérmico-isobárico en el cual se mantienen constantes el número de átomos (N), la presión (P) y la temperatura (T).
19. **OPLS-AA** = Potenciales optimizados para simulaciones en líquidos, versión todos los átomos (*Optimized potentials for liquid simulations all-atom*), es un campo de fuerza popular para simular líquidos y biomoléculas.

20. **Panalérgeno** = Son moléculas ubicuas en la naturaleza con una función esencial y cuya estructura comparte una elevada homología entre diferentes especies responsables de la reactividad cruzada.
21. **Polinosis** = Alergia al polen.
22. **RMSD** = Raíz de la desviación cuadrática media (*Root-mean-square deviation*).
23. **RMSF** = Raíz de la fluctuación cuadrática media (*Root-mean-square fluctuation*).
24. **SASA** = Área de superficie accesible al solvente (*Solvent accessible surface area*).
25. **SAV** = Volumen accesible al solvente (*Solvent accessible volume*).
26. **Sibilancia** = Sonido silbante y chillón durante la respiración, causado por rinitis alérgica, asma, entre otras enfermedades relacionadas al sistema respiratorio.
27. **SIT** = Inmunoterapia de un alérgeno específico (*Allergen-specific immunotherapy*).
28. **TM-Score** = Es una escala propuesta para medir la similitud estructural entre los modelos provistos por el servidor I-TASSER.
29. **vdW** = *van der Waals*.
30. **Z-Score normalizado**= Una alineación con un *Z-score* normalizado  $>1$ , refleja una alineación segura entre los 10 mejores homólogos.

## RESUMEN

La alergia es una enfermedad causada por la respuesta exagerada del sistema inmune ante agentes extraños para el cuerpo llamados alérgenos y está mediada por la Inmunoglobulina E (IgE), la cual genera una reacción alérgica. Actualmente, se ha señalado como una nueva enfermedad respiratoria la alergia al polen o polinosis, ya que afecta alrededor del 30 - 40% de la población mundial, alterando la salud y calidad de vida a millones de personas. El objetivo del presente trabajo es evaluar la influencia del pH en la estabilidad estructural de la polcalcina *Jun o 2* presente en el polen del maíz, en su forma aislada y en la interacción del complejo antígeno-anticuerpo. Para lograr este fin se emplearon técnicas computacionales (modelamiento estructural, simulaciones de DM, acoplamiento molecular y metodología del MM-PBSA). Los resultados mostraron la importancia de la declaración de los residuos protonados a pH neutro, ya que mejora la convergencia en las simulaciones de DM. También, se observó que a pH 7 se obtuvo mayor interacción entre los epítopos y el CDR de la IgE. Además, que a pH 5 la polcalcina adopta una estructura cerrada, causando una menor interacción con la IgE al realizar el acoplamiento molecular. Finalmente, en la evaluación de la unión con el calcio, revela que su posición estable es a pH 7 mientras que a pH 5 esta es desplazada debido a la nueva conformación que está adoptando la polcalcina.

### Palabras Claves:

Jun o 2, pH, protonación, dinámica molecular, energía de interacción.



## ABSTRACT

Allergy is a disease caused by the exaggerated response of the immune system to foreign agents called allergens and is mediated by Immunoglobulin E (IgE), which generates an allergic reaction. Currently, pollen allergy or pollinosis has been identified as a new respiratory disease, since it affects around 30-40 % of the world population, altering the health and quality of life of millions of people. The objective of this work is to evaluate the influence of pH on the structural stability of the polcalcin *Jun o 2* present in maize pollen, in its isolated form and on the interaction of the antigen-antibody complex. To achieve this end, computational techniques were used (structural modeling, MD simulations, docking and MM-PBSA methodology). The results showed the importance of the declaration of the protonated residues at neutral pH, since it improves the convergence in the DM simulations. Also, it was realized that it is a pH 7, a greater interaction between the epitopes and the CDR of the IgE was obtained. In addition, that at pH 5 the polcalcin adopts a closed structure, causing a low interaction with IgE when carrying out molecular docking. Finally, in the evaluation of the binding with calcium, it reveals that its stable position is at pH 7 while at pH 5 it is displaced due to the new conformation that polcalcin is adopting.

**Key words:**

Jun o 2, pH, protonation, molecular dynamics, interaction energy.



## ÍNDICE

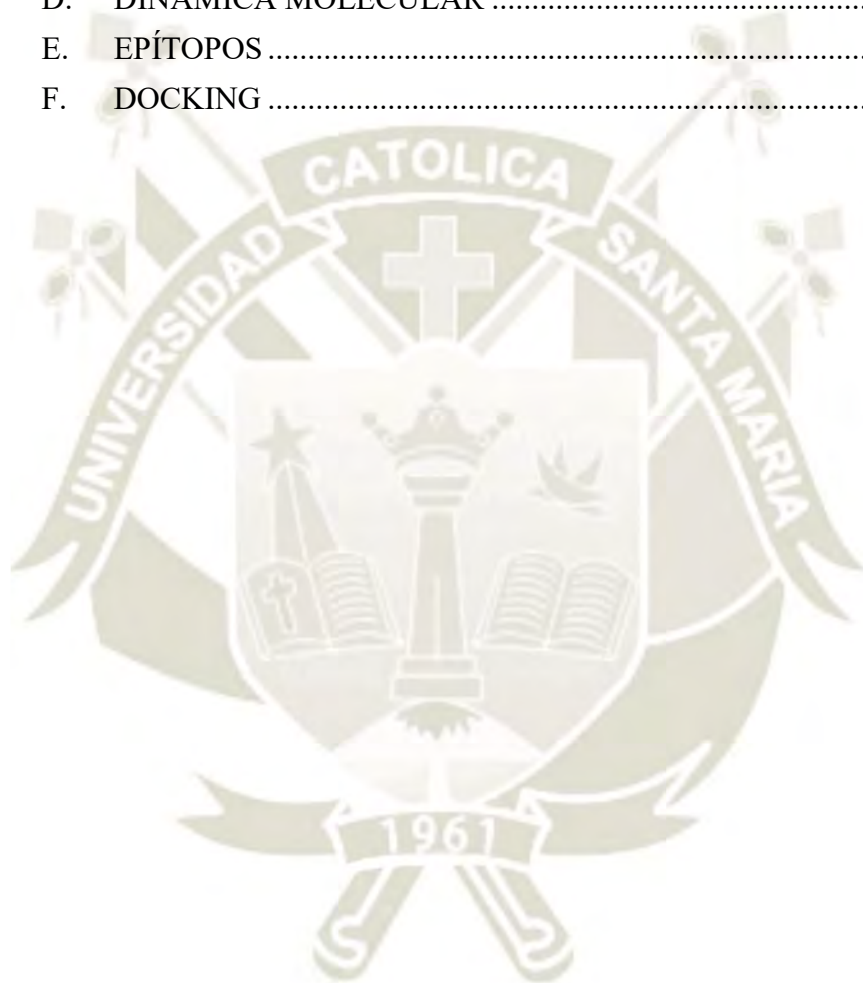
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
GLOSARIO .....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN .....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Maíz 5	
1.1.1. Antecedentes.....	6
1.1.2. Cultivo del Maíz.....	6
1.2. Polen 7	
1.2.1. Estructura.....	7
1.3. Alergia .....	8
1.3.1. Alergia al polen .....	9
1.3.2. Tratamiento y Diagnóstico.....	10
1.3.3. Alérgeno.....	11
1.3.4. Reactividad Cruzada .....	12
1.4. Polcalcinas.....	13
1.4.1. Estructura.....	13
1.4.2. Epidemiología.....	14
1.4.3. Jun o 2.....	14
1.5. Inmunoglobulina E .....	15
1.5.1. Interacción Jun o 2 e Inmunoglobulina E .....	16
1.6. Química Computacional.....	17
1.6.1. Modelamiento de proteínas.....	17
1.6.2. Dinámica Molecular .....	20

1.6.3. Docking Proteína-ligando .....	23
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
2.1. Detalles Computacionales.....	25
2.1.1. Hardware.....	25
2.1.2. Bases de Datos .....	25
2.1.3. Software .....	26
2.2. Métodos .....	31
2.2.1. Búsqueda de la estructura .....	31
2.2.1.1. Modelamiento de la Polcalcina .....	32
2.2.2. Refinamiento del Modelado .....	32
2.2.3. Acondicionamiento del Calcio .....	33
2.2.4. Acondicionamiento de pH.....	33
2.2.5. Evaluación de la Protonación en GROMACS .....	34
2.2.6. Evaluación de los pH 5 y 6 .....	34
2.2.7. Predicción de los epítomos .....	36
2.2.8. Acondicionamiento de la Inmunoglobulina E.....	37
2.2.9. Docking entre la Polcalcina y la IgE .....	37
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>41</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
3.1. Obtención de la Estructura .....	41
3.1.1. Modelamiento de la Polcalcina .....	41
3.1.2. Acondicionamiento del Calcio .....	44
3.1.3. Caracterización de la Polcalcina .....	45
3.2. Análisis de los estados de protonación a pH neutro.....	49
3.3. Análisis de la Dinámica Molecular a distintos pH .....	53
3.4. Análisis de los epítomos .....	58
3.5. Análisis del acoplamiento molecular .....	59
3.5.1. Dinámica molecular.....	59
3.5.2. Análisis de la energía de interacción .....	62
3.5.3. Evaluación de la distancia del calcio .....	64
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>68</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>69</b>
--------------------------	-----------

<b>APÉNDICE.....</b>	<b>75</b>
----------------------	-----------

A. MODELADO.....	75
B. ANÁLISIS DE LOS ESTADOS DE PROTONACIÓN EN EL SOFTWARE GROMACS .....	82
C. ESTADOS DE PROTONACIÓN DE LOS RESIDUOS EN LA POLCALCINA JUN O 2 y LA IGE .....	86
D. DINÁMICA MOLECULAR .....	88
E. EPÍTOPOS .....	92
F. DOCKING .....	95





# INTRODUCCIÓN

La alergia es una enfermedad causada por la respuesta exagerada del sistema inmune ante agentes extraños para el cuerpo llamados alérgenos. Es mediada por la Inmunoglobulina E (IgE), que interacciona con el alérgeno (complejo antígeno - anticuerpo), generando una reacción alérgica. La cual es expresada por síntomas comúnmente observados en las alergias como son la anafilaxia, la fiebre de heno, conjuntivitis, asma, urticaria y dermatitis atópica.

La alergia al polen o polinosis hoy en día se encuentra entre las enfermedades respiratorias que afectan alrededor del 30 - 40 % de la población mundial, alterando la salud y calidad de vida a millones de personas (1). En base al Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia (ISAAC) muestra que el 48 % de niños en Perú mostraron sibilancias desde que nacieron y el 26 % en el año que se realizó este estudio (2). Pruebas cutáneas para alergia arrojaron resultados positivos en Lima (97 %) y Tumbes (95 %) (3).

Entre los alérgenos del maíz encontramos a las Polcalcinas, que son un grupo de proteínas alergénicas unidas al calcio (PBC) altamente reactivas. Ubicadas específicamente dentro del polen, las PBC son una de las proteínas causantes de la polinosis. La investigación sobre la sensibilización ante los alérgenos polínicos del maíz ha generado diversos estudios, demostrando que los sujetos sensibles al polen de maíz presentan signos de hiperemia conjuntiva, obstrucción nasal, rinorrea acuosa, entre otros síntomas. Clínicamente se documentó que esta sintomatología coincidía con el tiempo de la polinización del maíz (4), siendo las principales víctimas trabajadores y personas en contacto con cultivos de maíz, ya que la presencia de este alérgeno los sensibilizó a este tipo de polen (5).

Existen estudios experimentales (6) que demuestran que el pH influye en el reconocimiento de la Inmunoglobulina E hacia la polcalcina *Jun o 2* evitando la reacción alérgica. En este trabajo de tesis teórico - experimental, se pretende determinar la influencia del pH en el complejo antígeno-anticuerpo empleando métodos computacionales bioinformáticos.

Para este fin, se realizó el modelamiento estructural de la polcalcina *Jun o 2* mediante la técnica de *Threading*; se usaron simulaciones de dinámica molecular (DM) para observar los cambios estructurales de la polcalcina en forma aislada y en el complejo antígeno-anticuerpo a distintos pH5; análisis de acoplamiento moleculares (*docking*) polcalcina - IgE se usaron para determinar los sitios de unión más favorables y se realizaron estudios energéticos (MM-PBSA) para

determinar la fuerza de unión en las interacciones. Finalmente se analizaron los resultados para comprobar que factores son los que intervienen en el reconocimiento alérgeno - anticuerpo.



## HIPÓTESIS

Dado que la variación del pH inhibe la identificación de la inmunoglobulina E con la polcalcina *Jun o 2*; es posible determinar un pH en el cual no exista el reconocimiento de la IgE mediante el uso de métodos computacionales bioinformáticos.





## OBJETIVOS

### Objetivos Generales

- Determinar mediante simulación de Dinámica Molecular la influencia del pH en la estabilidad estructural de la polcalcina *Jun o 2* presente en *Zea Mays* (maíz) respecto a su forma aislada e interactuante con la inmunoglobulina E.

### Objetivos Específicos

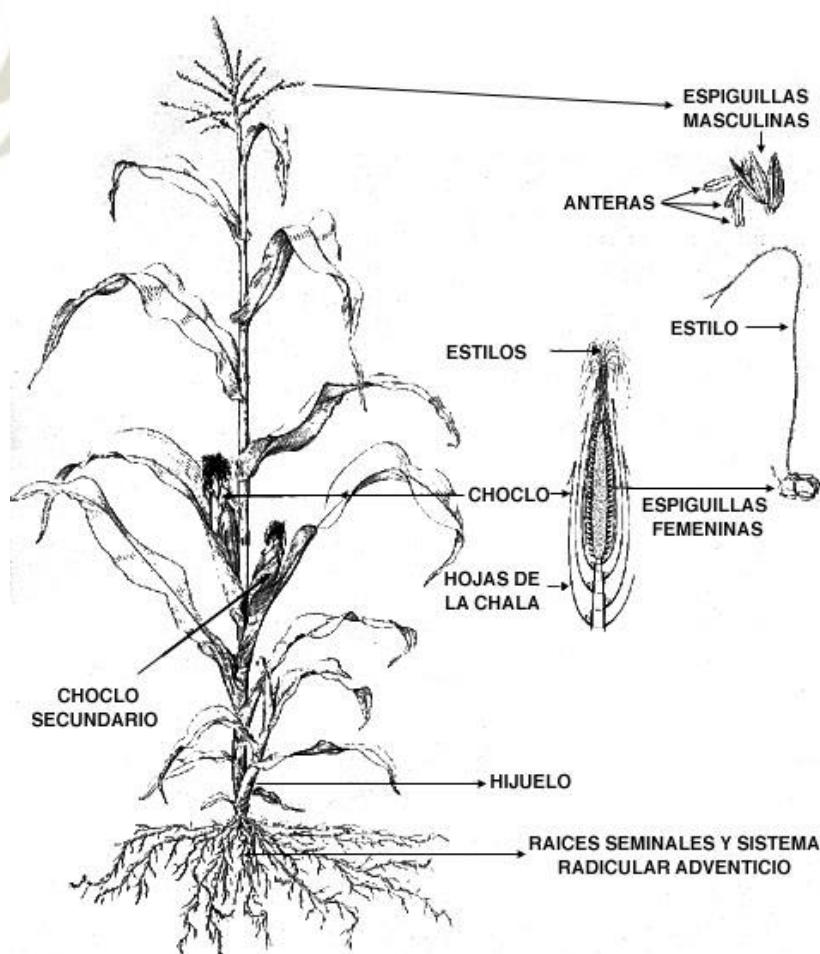
- Modelar la estructura del alérgeno *Jun o 2* por la técnica de *Threading*.
- Desarrollar la simulación de dinámica molecular a pH neutro y a distintos pH (5 y 6).
- Analizar la interacción de la inmunoglobulina E con la polcalcina *Jun o 2* mediante técnicas computacionales.
- Determinar la influencia del enlace de calcio y la variación de éste debido a los distintos pH.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Maíz

El maíz es un cultivo que pertenece a la familia *Poaceae* conocidas como gramíneas, conformada por trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y caña de azúcar (7). Esta es una planta de tallo largo erecto que alcanza hasta los 4 metros de altura, con un copioso número de hojas lanceoladas encajadas alternas al tallo, un sistema de raíces fibrosas, es decir forma abundantes raíces adventicias (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Morfología del Maíz. Fuente: Hafliger, E. (1979). Maize.

Es una planta monoica, por lo tanto, presentará los gametos masculinos y femeninos. La inflorescencia femenina o mazorca, crece a partir de las yemas axilares de las hojas pegadas al tallo. En la parte superior de esta planta se encuentra la inflorescencia masculina o panoja, conformado por una espiga central y debajo de ésta, las espigas laterales, las cuales contienen a las espiguillas. Estas espiguillas presentan tres estambres donde se forman entre 20 a 25 millones de granos de polen (8) (9) (10).

### 1.1.1. Antecedentes

Rebeca Salvador & María Pedrosa (11) exponen que "[...]los estudios sobre fósiles han señalado que el maíz se originó en el Teocintle, en México, y luego (hace 8000 años) domesticado en dos áreas del continente americano: Mesoamérica (México - Guatemala) y los Andes (Perú - Bolivia) que producen dos colecciones genéticas diferentes de maíz: genes mesoamericanos y andinos". Sin embargo, hay vestigios de maíz que datan de aproximadamente entre 6700 y 3000 años en los sitios arqueológicos de Los Paredones (Nasca) y Huaca Prieta en el valle de Chicama (La Libertad) (12). Por otro lado, existen registros de cultivos de maíz en Perú entre los años 3000 a 1800 a.C. en el valle de Fortaleza y el Norte Chico ubicados al norte del departamento de Lima (13).

Actualmente se han registrado casos de alergia debido al maíz, cultivo empleado desde la antigüedad, que señalan a sujetos sensibles al polen de este cereal, los cuales presentan signos de hiperemia conjuntiva, obstrucción nasal, rinorrea acuosa y sibilancias. También se documentó clínicamente casos de rinoconjuntivitis alérgica estacional y asma, que coincidían con el tiempo de la polinización del maíz (4). Estos estudios demostraron que los principales afectados eran trabajadores y personas que estaban en permanente contacto con estos cultivos (4) (5), por ello el polen de maíz ha tomado relevancia como un nuevo panalérgeno.

Mediante un estudio biológico computacional, se emplearon herramientas de modelado por homología y se revisaron bases de datos que han ayudado a la clasificación de las proteínas alergénicas del maíz. Estos autores clasificaron estructuralmente 17 familias de alérgenos, donde las polcalcinas se ordenaron dentro de la categoría *Zea m 7*, que es referida a las proteínas unidas al calcio (CBP) (4).

### 1.1.2. Cultivo del Maíz

El MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego), cada año publica un libro que es empleado como orientador para la siembra de productos agrícolas. Entre ellos una gran



variedad de granos como el maíz amarillo duro, el maíz amiláceo, el maíz choclo y el maíz chala (14).

Las previsiones para la siembra de maíz amarillo duro para el 2020 fue de una alta producción, que contó con 273 mil hectáreas, incrementándose en 3.7 % respecto a lo ejecutado en la campaña agrícola entre los años 2018 - 2019 en comparación con las demás variedades de maíz. Su producción estuvo enfocada para la industria de alimentos balanceados, actividad avícola, porcícola y animales de engorde. La siembra de este cultivo normalmente se realiza entre los meses de agosto a octubre y de enero a marzo, alcanzando las 178.3 mil hectáreas que representan el 65 % en las intenciones de siembra en este cultivo (15).

## 1.2. Polen

Los granos de polen son también llamados gametos masculinos de las plantas. Formados en el interior de los estambres, que al madurar son liberados al medio ambiente, pueden alcanzar distancias de hasta dos kilómetros. De esta forma, la polinización realizada por el viento le confiere su carácter anemófilo. Respecto al maíz, es una planta alógama o autógama, la fecundación solo es viable entre su misma especie (16). Debido a esta liberación del polen, el maíz es una importante fuente de aeroalérgenos en el medio ambiente. La exposición a este tipo de polen depende de distintos factores como son la especie de planta, la propagación o el cultivo silvestre, el área geográfica, la altitud, las corrientes de aire, la temperatura y las precipitaciones.

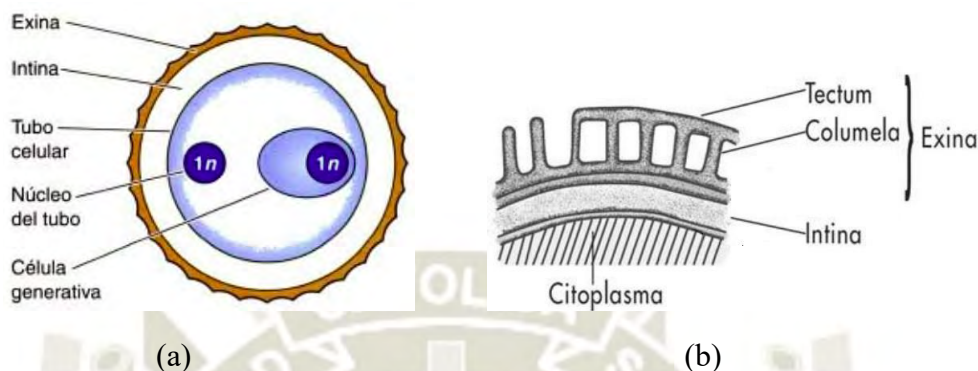
### 1.2.1. Estructura

Los pólenes están recubiertos por una pared de notable resistencia llamada exina (Figura 1.2a), la cual está constituida por uno de los materiales más inalterables de la naturaleza, la esporopolenina. Ésta no es afectada por las variaciones térmicas y le confiere al polen resistencia ante sustancias ácidas y básicas.

Como cualquier célula, el polen se caracteriza por su tamaño y forma. También, existen otras características que lo describe, como la estructura de su exina y los poros o aperturas que pueden presentar. De éstas últimas deben observarse el tipo, número y disposición en la superficie del grano.

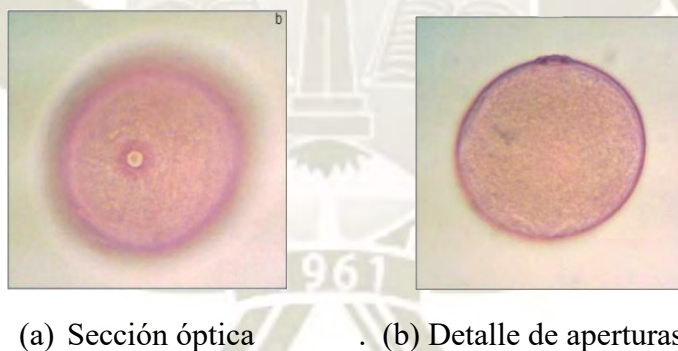
En la capa externa del polen, se forman los orbículos o cuerpos de Ubicsh que están hechos de esporopolenina (Figura 1.2b). Los orbículos se encuentran de forma alineada en las básculas o columelas, las cuales son paredes tangenciales y el *Tectum* o

tapete, que son las paredes radiales del polen (17) (18). Esta última estructura secreta al *Pollenkitt*, que está compuesto por ceras, lípidos, moléculas aromáticas y proteínas. De estas últimas, se ha observado que en las familias de cupresáceas y gramíneas se encuentran proteínas con propiedades alergénicas (19).



**Figura 1.2:** (a) Estructura del Polen. Fuente: Gilbert, S. F. (2005). (b) Representación de las paredes estructurales del polen. Fuente: Villa, M. A. R. (2009).

El grano de polen del maíz trinuclear (Figura 1.3), contiene un núcleo vegetativo, dos núcleos generativos y abundantes granos de almidón, siendo la exina e intina, quienes le dan protección en el medio ambiente.



**Figura 1.3:** Fotografía microscópica de un Polen de Maíz.  
Fuente: Rosas-Alvarado, A., et al. (2011).

### 1.3. Alergia

La alergia, también conocida como hipersensibilidad Tipo 1 (20), es una enfermedad que actualmente ha ido aumentando mundialmente. Considerando que es una reacción exagerada generada en respuesta al estímulo ante la entrada de alérgenos al cuerpo, son mediadas por la inmunoglobulina E (IgE) (21). La respuesta rápida de forma inadecuada y exagerada puede desencadenar patologías que entre las más relevantes se encuentran (22):

- Migrañas.
- Conjuntivitis.



- Rinitis estacional.
- Laringitis, asma, bronquitis.
- Estomatitis.
- Urticaria, eccema.
- Choque anafiláctico.

Se han descubierto factores hereditarios en estudios genéticos asociados a la atopia, asma, rinitis y otras enfermedades alérgicas en los siguientes cromosomas: 5, 6, 11q, 12 y 13q1 (23) (24) (25). También se ha observado que la probabilidad de que un paciente sea alérgico varía de acuerdo a los antecedentes familiares, entre un 30 % cuando el gen lo tiene un progenitor, a un 60 % cuando ambos lo tienen. Otros factores de la sensibilización es el tiempo de exposición y cantidad ante los agentes alérgicos (22).

### 1.3.1. Alergia al polen

La polinosis es considerada una enfermedad que hoy en día presenta una alta tasa de crecimiento. El polen es un aeroalérgeno ampliamente estudiado entre otros alérgenos como son los hongos, ácaros, polvo, etc.

El estudio de esta biopartícula alérgica ha sido de gran interés, ya sea por ser un factor de la contaminación atmosférica, es decir, analizando su movimiento y además cómo éste impacta en la salud del ser humano. El incremento de la investigación en este ámbito será de gran ayuda para obtener mayor conocimiento sobre este tipo de alérgeno y sus patologías para tener un rápido tratamiento a los afectados (26).

Un estudio mostró la relación entre la sensibilización a alérgenos estacionales (ciprés, pasto, olivo, plátano de sombra y parietaria) y concluyó que los individuos sensibilizados sufrieron de síntomas graves e intermitente de rinitis, una calidad de vida más restringida y desarrollaron con mayor rapidez el asma desde el inicio de la rinitis, aunque el asma tendió a ser menos grave en estos pacientes (27).

La capacidad alérgica del polen se debe a los propios granos de éste, que se depositan en las mucosas. Los estudios aerodinámicos realizados sugieren que las partículas de dimensiones mayores a 10  $\mu\text{m}$  quedan retenidas en las vías respiratorias superiores. Enfermedades como asma y la rinitis alérgica son afecciones inflamatorias crónicas persistentes del tracto respiratorio relacionadas con la polinosis.

Ha sido posible observar en animales expuestos a grandes cantidades de polen, que entre 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, lo cual



puede ser peligroso durante el ejercicio físico en los humanos. Con estas proposiciones, se considera que el porcentaje de granos de polen que alcanzan a penetrar en los bronquios es pequeño, por lo que se cree que la aparición de asma estaría determinada en mayor medida por la cantidad de polen acumulado, no por la exposición diaria. Esto último también podría explicar el desfase cronológico que habitualmente se observa entre la aparición de los síntomas de la rinoconjuntivitis y el posterior desarrollo de las manifestaciones asmáticas (16).

### 1.3.2. Tratamiento y Diagnóstico

El diagnóstico se basa primordialmente en el historial médico del paciente, el examen físico y las pruebas de IgE in vivo, contrariamente a las pruebas in vitro comúnmente empleadas para el diagnóstico de alergia. Sin embargo, la evaluación de la sensibilización, particularmente en base a los componentes alergénicos, proporcionan la posibilidad de distinguir entre sensibilización genuina y reactividad cruzada. Los avances con el empleo de técnicas moleculares a sido provechoso para el diagnóstico de alergias haciendo uso de los alérgenos recombinantes (28).

Los alérgenos recombinantes son obtenidos de alérgenos naturales reconocidos que han sido clonados biotecnológicamente y están estandarizados para ser empleados en diversos ámbitos, por ejemplo, en el diagnóstico alergológico molecular, el estudio estructural y funcional de la patogénesis de la alergia, a fin de desarrollar nuevas alternativas en el tratamiento de ésta, etc. (29) (30) (31).

Finalmente, el detallado perfil de sensibilización del paciente es esencial para una inmunoterapia alérgica específica (SIT) exitosa (27). Este moderno tratamiento molecular se encarga de prevenir el desarrollo de la reacción alérgica y que el efecto sea permanente (28).

**1) Tratamientos Sintomáticos:** Contrarrestan la reacción alérgica (32), entre los principales están:

- **Cromomas (cromoglicato y nedocromil):** Compuestos que estabilizan las células cebadas e inhiben la degranulación mastocitaria e interfieren en la liberación de los mediadores pro-inflamatorios causantes de las reacciones alérgicas.
- **Antihistamínicos:** Bloquean competitivamente los receptores histaminérgicos

H1. Se utilizan para el tratamiento sintomático de muchas enfermedades alérgicas, sobre todo para el tratamiento de rinitis, conjuntivitis, eccema y urticaria alérgica (no se ha demostrado su eficacia en el tratamiento del asma bronquial).

- **Broncodilatadores:** Fármacos que relajan la musculatura lisa bronquial, responsable al contraerse de los efectos obstructivos propios de las crisis asmáticas.
- **Corticoides:** Grupo de fármacos, derivados de los esteroides, en los que se ha potenciado su acción antiinflamatoria al reducir al máximo sus efectos sobre el metabolismo endógeno. Son muy usados como tratamiento de diversas enfermedades alérgicas (asma, rinitis, urticaria, dermatitis atópica y anafilaxia). Pueden administrarse por vía tópica cutánea, inhalatoria, oral e inyectable.
- **Antileucotrienos (montelukast, zafirlukast, zileuton):** Fármacos que se unen a los receptores de leucotrienos, situados en las células de las vías respiratorias. Impiden la unión entre éstos y los mediadores pro inflamatorios, además de bloquear los efectos que éstos causan. Es el tratamiento más común en los casos de asma leve y moderada.
- **Macrólidos inmunomoduladores (tacrolimus, pimecrolimus):** Debido a sus propiedades inmunosupresoras, son empleados como terapia frente a las manifestaciones alérgicas cutáneas.

2) **Tratamiento etiológico:** Se trata de inmunoterapia o hiposensibilización. Actualmente es empleado para disminuir la respuesta del individuo alérgico frente al alérgeno y modificar el curso natural de la enfermedad alérgica. Consiste en la administración de dosis crecientes de un extracto alergénico que lleva a la formación de anticuerpos bloqueadores que se fijan al alérgeno antes de que éste llegue a unirse a las IgE de la superficie de los mastocitos, evitando así su degranulación (32).

### 1.3.3. Alérgeno

Los alérgenos son sustancias extrañas que al ingresar al cuerpo humano causan la reacción alérgica debido a que son identificadas como peligrosas (32). Es difícil clasificar a los agentes o sustancias externas que tendrán la capacidad de convertirse en alérgenos, ya que éstos pueden compartir secuencias con alérgenos identificados, logrando de esta

manera, sensibilizar más al paciente.

El grado de reacción alérgica dependerá del nivel, tiempo y vía de exposición, ésta última determinará el tipo enfermedad alérgica. En el ambiente, los granos de polen trabajan como aeroalérgeno, causantes de la polinosis. El sistema respiratorio es el órgano diana o target del polen en el aire, resultando en dos tipos de trastornos de hipersensibilidad: la inmediata en individuos genéticamente predispuestos y la tardía, que en otros pacientes causan manifestaciones clínicas de rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica, etc.

Dentro de la estructura del alérgeno, se refiere al término Epítopo como al determinante antigénico o parte de una molécula, reconocida por el anticuerpo o Inmunoglobulina E, formando el complejo antígeno - anticuerpo. La IgE está unida a las células efectoras, basófilos y mastocitos, que al formarse el complejo desencadenará la respuesta alérgica (33).

#### **1.3.4. Reactividad Cruzada**

Teniendo en cuenta que la alergia resulta del reconocimiento antígeno - anticuerpo, se ha observado que los pacientes alérgicos han presentado síntomas ante diferentes fuentes de alérgenos. Con esta premisa, el hecho de que un alérgeno en su secuencia tenga epítomos compartidos o similares respecto a otro, da a lugar una condición sintomatológica conocida como reactividad cruzada (26).

Taxonómicamente, se esperaría que las plantas del mismo género tuvieran el mayor número de alérgenos compartidos, mostrando así una alta reactividad cruzada. Asimismo, plantas de la misma familia compartirían una menor cantidad de alérgenos disminuyendo esta reactividad. Por consiguiente, las plantas relacionadas de forma distante tendrían una mínima identificación y casi nula reactividad cruzada. Este enfoque ha sido validado para distintos tipos de alérgenos, con las excepciones más notables en las proteínas altamente conservadas como: profilinas, polcalcinas, etc. Los esquemas taxonómicos más antiguos se basaban principalmente en similitudes morfológicas, que a veces son engañosas debido a la bifurcación evolutiva (34). La reactividad cruzada es afectada por la cantidad de motivos EF-Hand. Los alérgenos que están conformados por 2 a 4 motivos, han registrado una mayor cantidad de reactividad cruzada con varias especies de plantas (35).



## 1.4. Polcalcinas

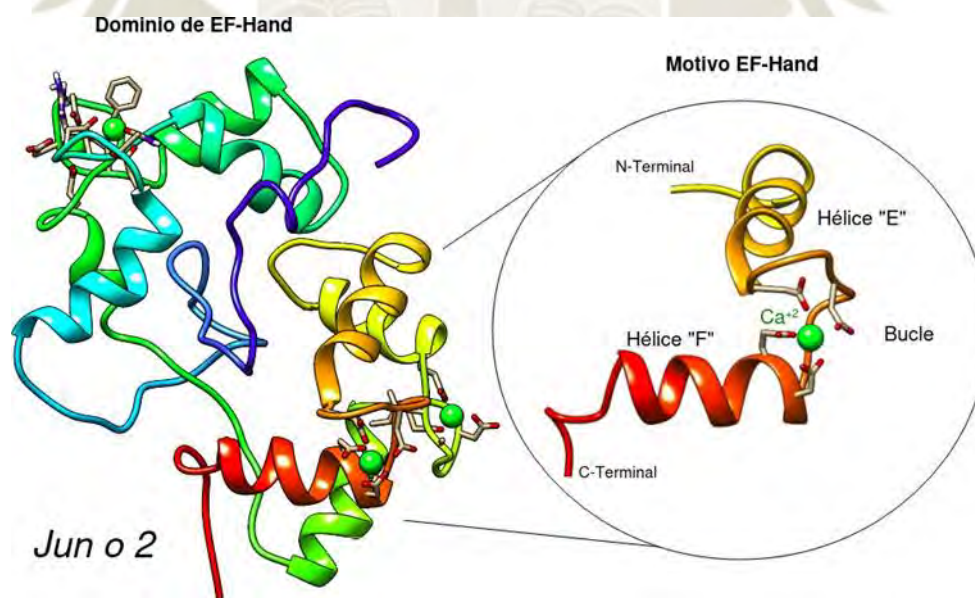
Las polcalcinas son proteínas alergénicas específicas al polen, conforman en gran medida la familia de las CBPs. A pesar de su alta reactividad cruzada, la sensibilización a las polcalcinas no está asociada con la alergia a los alimentos de origen vegetal (4), (36).

Se ha asociado su función biológica al control intracelular del nivel de calcio durante la formación del polen y en la intervención del proceso de señalización para el crecimiento del tubo polínico debido a su vinculación con el ion calcio (36), (37).

Se observó que en un estudio sobre reactividad cruzada, cerca del 10 % de los pacientes con polinosis mostraron una reacción alérgica con dos tipos de alérgenos al polen de varios árboles, pastos y malezas (38). Diferentes datos indican que la relevancia clínica de la sensibilización a polcalcina está relacionada con factores geográficos y al nivel de exposición a diferentes fuentes alergénicas (4).

### 1.4.1. Estructura

Las polcalcinas tienen una masa molecular de 9–28 kDa, dependiendo del número de motivos de la EF-Hand que sostienen (2, 3 o 4 motivos de la EF-Hand) y muestran una estructura monomérica o dimérica (6).



**Figura 1.4:** Estructura de la Polcalcina *Jun o 2*. Cada ion de calcio está asociado a un motivo EF-hand. En el zoom se muestra la estructura de un motivo EF-hand. Fuente propia.

Las proteínas en su mayoría  $\alpha$ -helicoidales contienen los motivos característicos de EF-Hand (estructura de hélice-bucle-hélice), que son responsables de la unión del calcio (4). Los motivos de EF-Hand incorporan en una  $\alpha$ -hélice “E” unida por un bucle, que contiene al calcio a otra  $\alpha$ -hélice “F” (39) (Figura1.4). Pueden asumir dos

conformaciones diferentes: cerrada, libre de  $\text{Ca}^{+2}$  llamada forma holo y una forma abierta con  $\text{Ca}^{+2}$  llamada apo que es más estable, resultando así en interacciones más fuertes con los anticuerpos IgE (40).

La unión coordinada a 7 oxígenos del ion calcio da una conformación bipiramidal pentagonal. También se ha observado que dichos iones están enlazados a través de 4 grupos de carboxilato o carboxiamida ( $\text{R-COO}^-$ ), y un único esqueleto de oxígeno carbonilo ( $\text{R-C=O}$ ), colocado en el bucle a una distancia específica (35). Los residuos que usualmente enlazan al calcio son los aminoácidos con carga negativa como el ácido aspártico y el ácido glutámico.

#### 1.4.2. Epidemiología

Las polcalcinas alergénicas se derivan del polen de árboles, pastos y malezas. Son de gran reactividad cruzada e inducen valoraciones de sensibilización entre 5-10 % de pacientes alérgicos al polen (41). Se ha observado que los factores de la sensibilización a nivel clínico dependen de la geografía y exposición a estos alérgenos (36).

En la gran familia de polcalcinas, la *Phl p 7* proveniente del *Timothy grass* ha presentado una mayor reactividad cruzada. Por lo tanto, podría utilizarse como marcador para identificar sensibilizaciones múltiples del polen (35).

Si bien las polcalcinas se encuentran exclusivamente en fuentes de polen, éstas no se han relacionado con ninguna reactividad cruzada entre el polen y los alimentos, por el contrario, están más implicadas en las reacciones respiratorias leves debidas a la inhalación (42).

La sensibilización a polcalcinas es de gran importancia, ya que se registran casos clínicos debido a su condición de panalérgenos entre especies distintas, como es el caso del reconocimiento de la IgE específica entre el alérgeno recombinante del *Timothy grass* (*rPhl p 7*) y la polcalcina del polen de maíz *Zea m 7*. Además, se ha observado que para el tratamiento alérgico de inmunoterapia, la reacción alérgica a las polcalcinas por sí solas no es muy común (monosensibilización), sin embargo, si se emplean dos alérgenos como polcalcina y profilina, hay un mejor tratamiento de inmunoterapia (36).

#### 1.4.3. Jun o 2

Es una polcalcina proveniente del polen de la familia *Cupressaceae*, del género *Juniperus oxycedrus*, de donde proviene la nomenclatura que se le ha dado en la clasificación como alérgeno (35) (43). Conocida inicialmente como *Jun o 2*, en el año



2003 la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) la renombró como *Jun o 4*. Sin embargo, existen bancos de datos (PIR, GenBank y SwissProt) que siguen reconociéndola como *Jun o 2*.

Este cambio de nomenclatura fue tomando como base a la categoría de alérgenos del polen de ciprés que corresponde al grupo 4, agrupándolo con la familia de proteínas unidas al calcio como es la *Bet v 4* del polen de abedul (43), (44). Este grupo tiene reactividad cruzada con las CBPs correspondientes al grupo 7 en las familias de alérgenos del ciprés y maíz (4), (45) no importando que difieran en tamaño (~9 kDa y ~20.4 kDa respectivamente).

En ambas plantas, la configuración estructural es la misma, con una forma abierta “Apo” en forma de barril y la configuración de las posiciones de los bucles y el rango de residuos que lo conforman son las mismas en la Tabla 1.1 (46).

**Tabla 1.1:** Características de las regiones que corresponden al bucle que contiene al calcio. Tabla obtenida de UniProt.

CARACTERÍSTICAS	POSICIONES	LONGITUD
<b>Unión al Calcio</b>	57 - 68	12
	93 - 104	12
	131 - 142	12
	167 - 178	12

La secuencia de la *Jun o 2* recombinante predicha experimentalmente contiene cuatro motivos de EF-hand con unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . También en el análisis en bases de datos como BLAST, esta polcalcina mostró que tiene una similitud con las calmodulinas de organismos como la acidia y las levaduras en un 55.4 % y 52.9 % respectivamente.

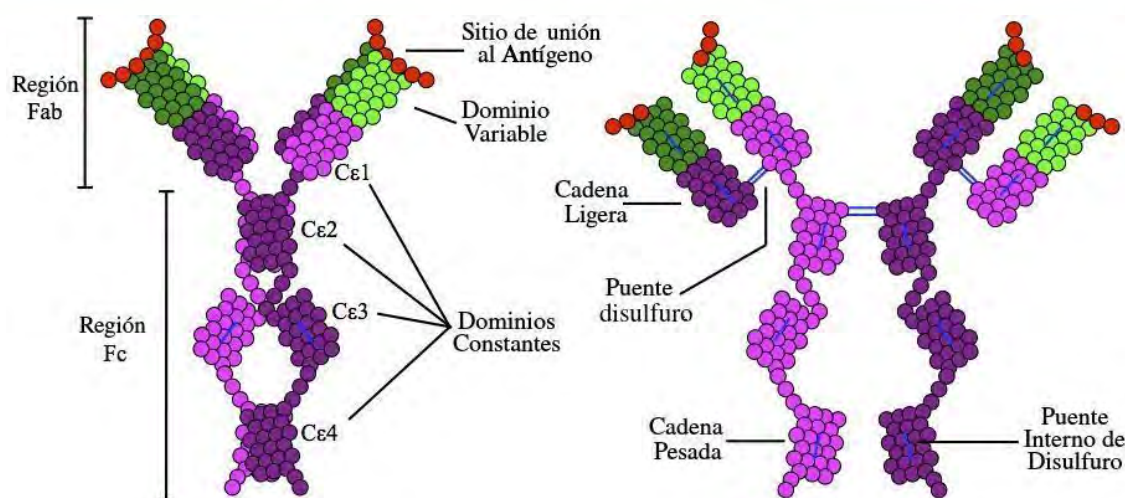
En este trabajo de tesis se referirá a esta polcalcina como *Jun o 2* indistintamente.

## 1.5. Inmunoglobulina E

Fueron descubiertas por Johansson e Ishizaka en 1967. Su función está relacionada con las enfermedades alérgicas, ya que éstas son mediadas por este tipo de anticuerpos (47).

La IgE es una proteína heterodimérica, con un peso molecular de ~192 kDa. Su tiempo de vida media en suero es de 3 días, debido a la tendencia de unirse a basófilos y mastocitos. Su intervención desencadena los síntomas del proceso alérgico como asma, rinitis alérgica y anafilaxis (48) (49).





**Figura 1.5:** Estructura de la Inmunoglobulina E. Fuente: Ribatti D. (2016)

Su estructura está conformada por dos cadenas ligeras (L); dos cadenas pesadas (H); una región variable (V), donde se realiza la unión al antígeno y la región constante (C), conformada por varios puentes disulfuro (48) (Figura 1.5).

La región donde se realiza la unión al antígeno es conocida como Fab (*antigen-binding fragment*), constituida por las cadenas ligeras y pesadas unidas por puentes disulfuro con el dominio variable (48) (49). Estructuralmente, son las regiones determinantes de complementariedad (CDR) las que se unen a los epítomos del alérgeno (50).

Por otro lado, la región Fc está formada por dos cadenas pesadas unidas por puentes disulfuro, su función es determinar la célula efectora. Tiene tres tipos de cadenas pesadas Cε2, Cε3 y Cε4. Es en el dominio Cε3 donde se forma la unión con la cadena α del receptor FcεRI (51) (52).

La aplicación de la investigación en la mediación de la inmunoglobulina para la alergia, es de gran utilidad a nivel molecular y con el amplio estudio de los mecanismos a las reacciones alérgicas, son empleadas para desarrollar nuevas estrategias de prevención, detección y tratamiento de esta enfermedad (53).

### 1.5.1. Interacción Jun o 2 e Inmunoglobulina E

Se ha observado que la menor cantidad de motivos EF-Hand ayuda al reconocimiento de IgE, ya que al contener varios dominios globulares la polcalcina, su interacción es afectada por la cercanía entre ellos (35).

Experimentalmente se observó que la inhibición del reconocimiento entre la Jun o 2 y la IgE por la variación del pH, sucede debido a dos hipótesis: la primera consiste en que el sitio de unión al calcio es un epítipo y la segunda, es que la presencia o ausencia del calcio modifica la estructura de la polcalcina afectando su unión a la IgE (6).

Dado estos argumentos, en el presente trabajo de tesis, hemos utilizado diferentes herramientas de la química computacional, a fin de dilucidar el efecto que tiene el pH en la ausencia o formación del complejo polcalcina - IgE. La finalidad de esta investigación fue reconocer, a nivel molecular, aquellos factores más relevantes que intervienen en estas interacciones.

## 1.6. Química Computacional

La química computacional es una disciplina que asentó sus bases en la investigación de modelos multiescala de sistemas químicos complejos. A partir de estas investigaciones es que ha tenido un rápido crecimiento, siendo aplicado en el modelado y la simulación por computadora de macrosistemas como las biomoléculas, polímeros, medicamentos, moléculas inorgánicas y orgánicas, etc. (54).

Desde su aparición, la química computacional ha evolucionado gracias al gran desarrollo de la tecnología del *hardware* y *software* computacional que comenzó a finales de los 90's. Con un alto poder de cómputo, usando instalaciones de alta tecnología y algoritmos numéricos más rápidos y eficientes, la química computacional ha logrado resolver problemas químicos y biológicos de forma teórica - experimental empleando modelos *in silico* (54).

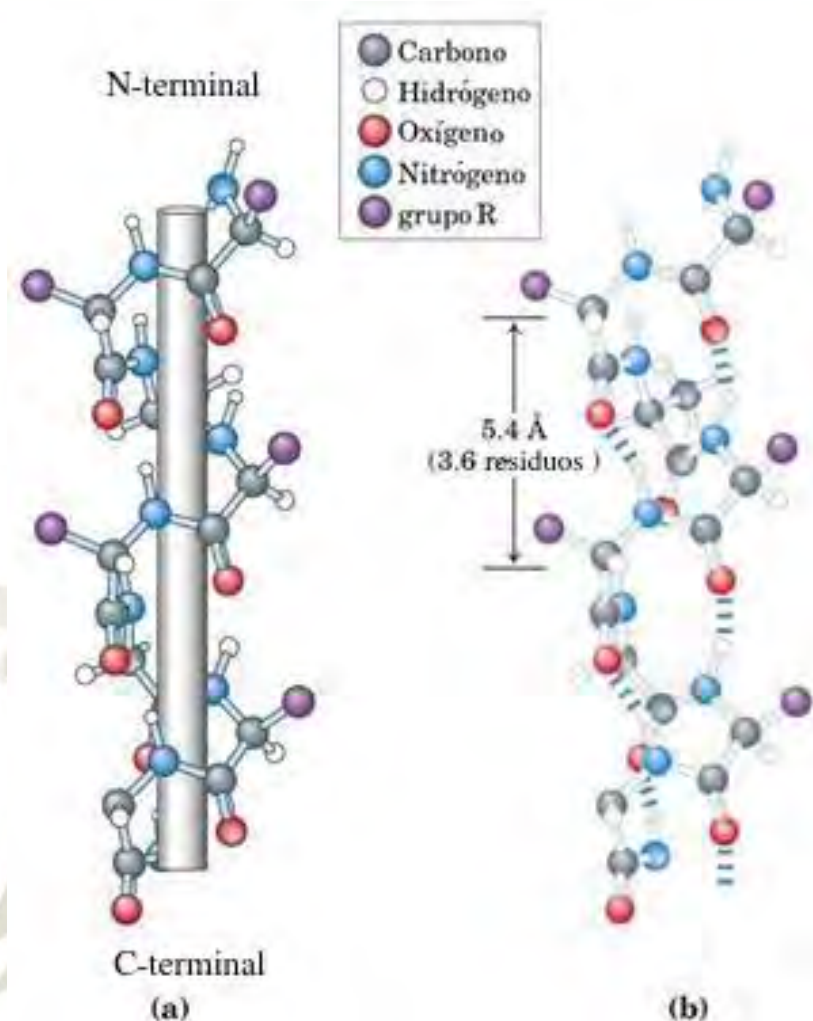
### 1.6.1. Modelamiento de proteínas

Dentro del estudio computacional, una de las herramientas ampliamente utilizadas es la visualización de las moléculas biológicas. Esto permite una mejor comprensión molecular de los complejos proteínicos y de sus interacciones derivando en una mayor capacidad de análisis en el desarrollo de su estudio.

Las estructuras más conocidas dentro de los modelos proteínicos son:

- 1) **Hélices alfa o  $\alpha$ -Hélices:** Es una estructura en forma de bastoncillo, cuya sección interior es una cadena fuertemente enrollada con sus cadenas laterales extendiéndose hacia afuera en una disposición helicoidal. Estas estructuras secundarias emplean los enlaces de hidrógeno entre los grupos CO y NH de la cadena principal para estabilizarse (Figura 1.6). El sentido del giro de las  $\alpha$ -hélices puede ser dextrógiro o levógiro, sin embargo, la  $\alpha$ -hélice dextrógira es más favorable debido a la menor cantidad de choques estéricos en la estructura entre las cadenas laterales y la cadena principal.



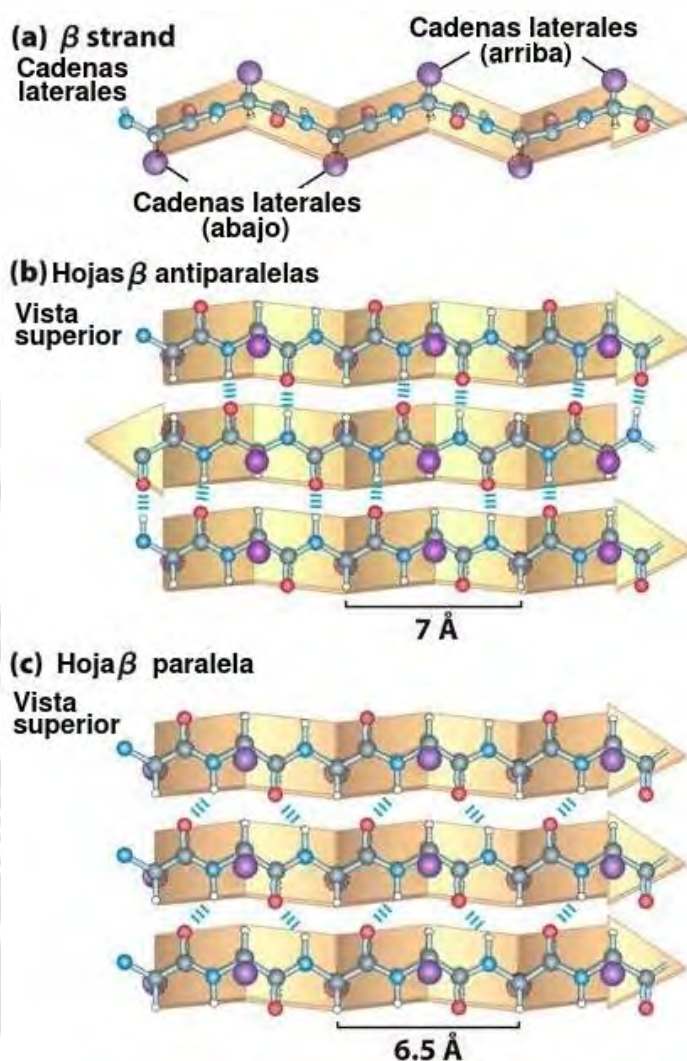


**Figura 1.6:** Estructura secundaria del tipo  $\alpha$ -hélice, (a) Formación de la estructura alrededor de un eje central. (b) Visualización de las medidas entre cada residuo.

Fuente: Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013).

- 2) **Hoja  $\beta$  o  $\beta$ -Sheet:** Una hoja beta, está conformada de dos a tres  $\beta$  *strands* o hebras, unidas por enlaces de hidrógeno. Estructuralmente, está extendida en lugar de estar enrollada con fuerza, como en las  $\alpha$  hélices, además de que las cadenas laterales apuntan en direcciones opuestas. Tienen dos conformaciones: antiparalela, cuyas hebras corren en direcciones opuestas, en la cual los átomos de los grupos -CO y -NH se unen de forma alineada (Figura 1.7.b). La otra conformación es del tipo paralelo y es cuando las hebras corren en la misma dirección. En esta conformación, los grupos -NH y -CO se enlazan con la hebra vecina de forma diagonal como se muestra en la Figura 1.7.c.

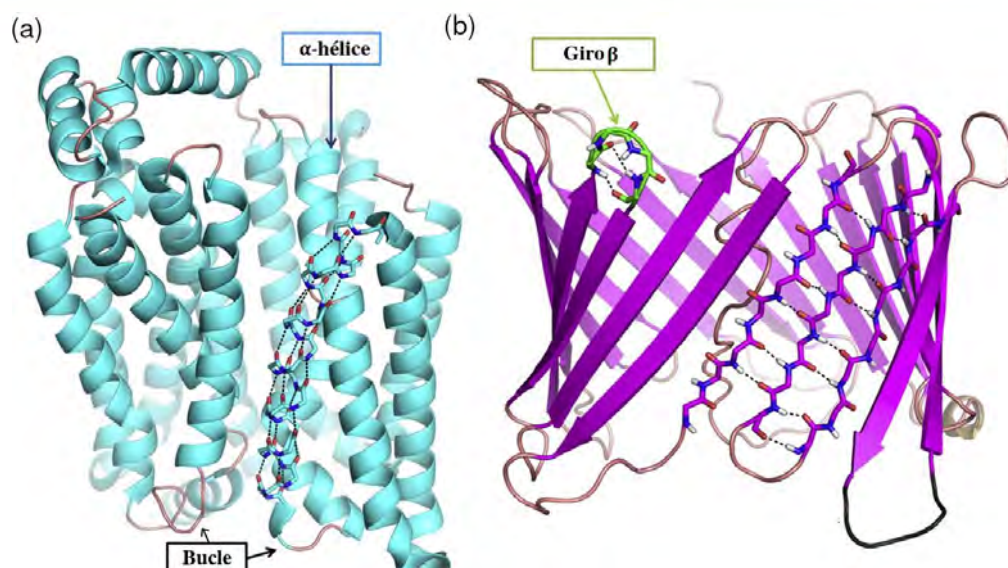




**Figura 1.7:** Estructura secundaria de tipo Hoja  $\beta$ . (a) Conformación de una hebra  $\beta$  o  $\beta$ -strand. (b) Formación de una hoja  $\beta$  de tipo antiparalelo. (c) Formación de una hoja  $\beta$  de tipo paralelo.

Fuente: Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013).

- 3) **Giro inverso y Bucles o Turns y Loops:** Para obtener las formas compactas o globulares, es decir la formación de estructuras más complejas, se requieren estructuras enlazantes que le den sentido a la molécula. El giro inverso (turn), estabiliza la estructura contra cambios repentinos de dirección, formando enlaces entre los hidrógenos y los grupos  $-CO$  y  $-NH$ . Los bucles (loops), también interviene en las inversiones de la cadena y son más enrevesados que los giros inversos. Son rígidos y bien definidos la mayor parte del tiempo.



**Figura 1.8:** Estructuras secundarias del tipo (a) Bucles y (b) Giro inverso.  
Fuente: Badal, S., & Delgoda, R. Eds. (2017).

Actualmente la investigación ha desarrollado varias bases de datos donde se encuentran las secuencias aminoacídicas, pero sin su información estructural secundaria. El modelado de estructuras complejas intenta predecir lo más preciso posible, la estructura de moléculas en base a su secuencia.

Empleando complejas técnicas matemáticas y de secuenciación, estos programas construyen diferentes modelos de estructuras tridimensionales que serán evaluados mediante puntajes propios de cada técnica, para probar su funcionalidad y qué tan cercano se encuentran estos modelos a las estructuras experimentales. Existen dos métodos ampliamente utilizados en el modelado de bioestructuras (55):

- **Modelado por Homología:** Basado en el porcentaje de identidad que existe entre la secuencia a modelar y las diferentes secuencias conocidas experimentalmente. Estas últimas secuencias deben de tener un porcentaje mayor al 70 % de identidad para ser utilizadas como plantillas en el modelamiento.
- **Threading:** Consiste en tomar una librería de estructuras proteicas homólogas a la secuencia que se desea modelar. Ésta es alineada tridimensionalmente a las distintas plantillas obteniéndose varios modelos que serán evaluados por medio de puntajes que derivan de patrones, ya sea en función a la energía, a la confiabilidad, al RMSD, etc.

### 1.6.2. Dinámica Molecular

Las simulaciones en dinámica molecular (DM), predicen las posiciones y el comportamiento de cada átomo dentro de un sistema molecular o una proteína en un



periodo de tiempo en base al modelo general de la mecánica física. Así, estas posiciones, velocidades e interacciones de las partículas son gobernadas por las ecuaciones de movimiento de Newton (56).

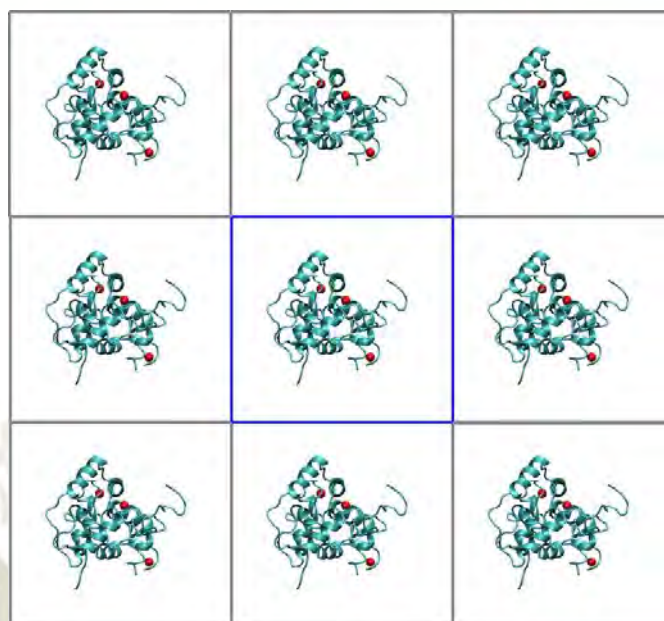
La DM es una metodología que, al ser aplicada, genera las trayectorias de un sistema caracterizado por un potencial de interacción intra e interatómico que puede estar condicionado a restricciones periódicas (PBC). Conformado por  $N$  partículas, las propiedades de los sistemas se obtienen mediante diferentes tipos de integraciones, las cuales se resuelven numéricamente de acuerdo al tipo de colectividad estadística que se ha formado, conocidos como ensambles moleculares.

En los cálculos de DM es común trabajar con los ensambles NVT y NPT que son los colectivos conocidos como canónico e isobárico-isotérmico respectivamente, ya que éstos nos brindan información respecto a las condiciones trabajadas de forma experimental (57).

La metodología de DM puede ser descrita brevemente de la siguiente manera:

- 1) Generación de la topología y solvatación: A partir de las posiciones y enlazamientos atómicos se genera el reconocimiento estructural de las sustancias, sistemas biomoleculares o sistemas químicos. Con esta información, se construyen las topologías utilizando parámetros no enlazantes (tipos de átomos y cargas), así como parámetros enlazantes (enlaces, ángulos y diedros). Estos parámetros están contenidos dentro de un campo de fuerza el cual los define previo a la simulación. Una característica importante en las simulaciones moleculares es definir el tamaño de la caja en base a las condiciones periódicas de contorno (PBC). Sus dimensiones dependerán en gran medida del tamaño finito del sistema ya que lo que se desea evitar son las interacciones de las biomoléculas del sistema con sus réplicas considerándose solo una celda unitaria en toda la simulación.





**Figura 1.9:** Representación esquemática de la idea de condiciones periódicas de contorno. Fuente propia.

Finalmente, se escoge el tipo de medio de solvatación en el que se realizará la simulación.

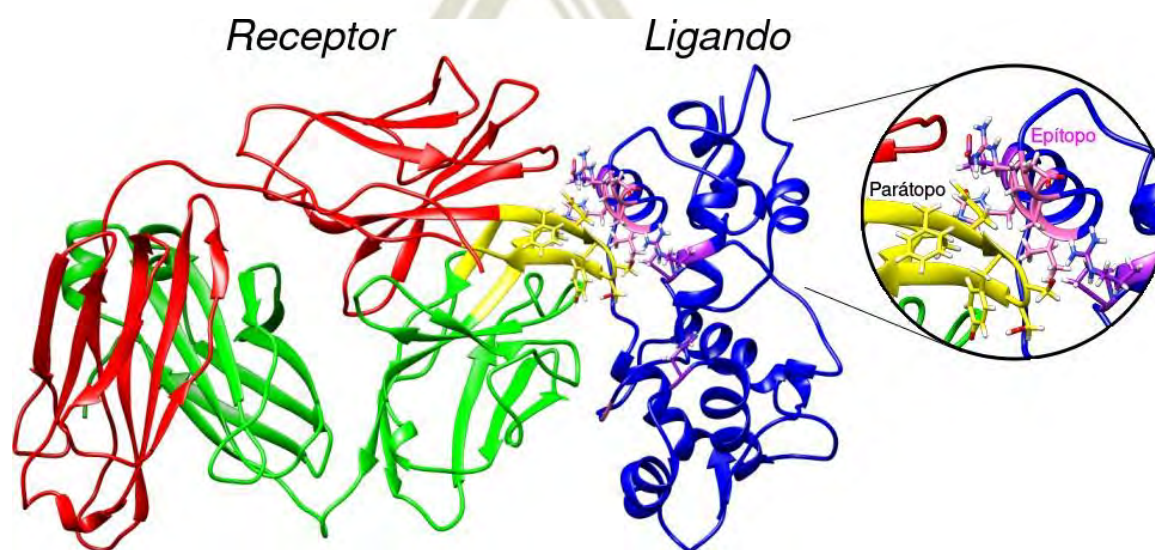
- 2) Minimización de energía: Normalmente las estructuras iniciales que se crean en los simuladores poseen una cantidad de energía mucho mayor debido a los choques estéricos provocados al construir estas estructuras. Por esta razón, se utilizan algoritmos para calcular las posiciones y fuerzas iniciales, con el objetivo de minimizarlas energéticamente reduciendo así, posibles superposiciones atómicas logrando estructuras cercanas a las proteínas en su forma natural.
- 3) Equilibrio: Para lograr una buena integración entre el medio y la proteína los sistemas se someten a un proceso de homeostasis resolviendo las ecuaciones de movimiento de Newton, hasta que las propiedades promedio de éste no cambien más con el tiempo, un ejemplo es la energía total. Este equilibrio consta de dos etapas, la primera es una simulación de DM en un ensamble canónico o NVT (constante número de átomos, volumen y temperatura). Esta simulación tiene como objetivo el acoplamiento de las moléculas en la caja de simulación y llevar al sistema a la temperatura objetivo. La segunda etapa consta de una DM en un ensamble isotérmico - isobárico, NPT (constante número de átomos, presión y temperatura) donde la simulación se lleva a cabo para permitir que el sistema encuentre la densidad correcta logrando una interacción óptima entre el solvente y la proteína.
- 4) Producción: En esta etapa se realiza la simulación de dinámica molecular pro-

piamente dicha, ya que las etapas previas sirvieron para condicionar las variables del experimento. En las DM de producción es donde se obtiene las diferentes propiedades de los sistemas una vez que alcanzan la estabilidad estructural. Estas simulaciones suelen tener alto costo computacional debido al gran número de pasos (steps) que derivan en simulaciones de larga duración.

Las aplicaciones de las simulaciones de DM en el campo biológico abarcan una amplia cantidad de procesos biomoleculares importantes, por ejemplo, el cambio conformacional, el acoplamiento de ligandos y el plegamiento de proteínas, además que mostrar la trayectoria de los átomos en un periodo temporal que puede ir de los femtosegundos (fs) hasta los microsegundos ( $\mu$ s). Es importante destacar que estas simulaciones también pueden predecir cómo responderán las biomoléculas a nivel atómico a perturbaciones como son las mutaciones, fosforilación, protonación y a la adición o eliminación de un ligando (58).

### 1.6.3. Docking Proteína-ligando

El método de Acoplamiento Molecular también conocido como Docking proteína- ligando, pertenece a una clase más amplia de técnicas generalmente conocidas como métodos basados en estructura (59), por lo que se asume un conocimiento previo de la estructura 3D tanto del receptor como del ligando. Por un lado, la estructura diana (receptor o parte del receptor), se puede obtener mediante diferentes métodos experimentales principalmente cristalografía de rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear o por métodos teóricos en servidores que cumplen el desafío de predecir la interacción de dos moléculas generando un modelo de unión (60)



**Figura 1.10:** Representación esquemática del acoplamiento proteína-ligando. Fuente propia.



Este método es realizado por mecánica molecular para los servidores o programas que se encargan del acoplamiento. Empleándose parámetros experimentales, los algoritmos buscan estructuras que asemejen a los modelos predichos con técnicas de laboratorio (60). Hoy en día se han desarrollado mejoras a este método, que se realiza en tres etapas:

- a) Primero, la preparación del complejo Proteína-Ligando, teniendo en cuenta el campo de fuerza que representará la superficie y las cavidades (Pockets) como sitios de unión.
- b) Segundo, definir el tipo de acoplamiento que puede ser rígido, semirrígido o flexible a fin de evitar los choques estéricos. Sin embargo, se ha implementado una mejora al problema de la flexibilidad, en base a los términos del cálculo energético.
- c) Tercero, establecer la estrategia de búsqueda de conformaciones de ligandos, que dependerán de la selección del algoritmo de acoplamiento que el servidor este empleando.



# CAPÍTULO II

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Detalles Computacionales

#### 2.1.1. Hardware

Para estos estudios se utilizó una WorkStation con un procesador E5 de 2.60 GHz, con una memoria RAM de 62 Gb, 3 discos duros de 1, 4 y 6 TB, dos tarjetas aceleradoras de video (GTX 980 con memoria dedicada de 4Gb y 3Gb).

#### 2.1.2. Bases de Datos NCBI

El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) fue creado para desarrollar sistemas de información para la biología molecular. Esta base de datos ofrece vía *online* una variedad de recursos así como de información, análisis y datos de sistemas biológicos o químicos (GenBank®, Protein, PubMed, PMC, BLAST, PubChem) (61) (62).

En esta base de datos se realizó la búsqueda de la polcalcina del maíz, eligiendo la *Jun o 2*. Se obtuvo información de la cantidad de aminoácidos y las referencias de procedencia de nuestra secuencia de aminoácidos en formato fasta, la que fue empleada en el modelamiento. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

#### UniProt

Este nombre son siglas que provienen de “*Universal Protein Resource*”. Es una base de datos que contiene más de 120 millones de proteomas. Estos proteomas están complementados por información organizada en diferentes categorías (función, interacción y expresión), según el tipo de datos que contienen. Así se facilita la búsqueda, ya que ofrece al usuario un fácil acceso a información de interés en relación a la proteína (46).

El empleo de este servidor fue muy útil para la adición de los calcios después del

modelamiento. La referencia de la ubicación de los residuos donde están colocados los calcios, además del peso molecular de la polcalcina y la taxonomía. Disponible en <https://www.uniprot.org/>

## Allergen Nomenclature

Se estableció para desarrollar un sistema de nomenclatura de alérgenos y está conformado por el Subcomité de nomenclatura de alérgenos de la FAO y IUIS, bajo el liderazgo de expertos en caracterización, estructura, función, biología molecular y bioinformática de alérgenos. En esta base de datos se proporciona y gestiona la nomenclatura oficial de muchos alérgenos. Se espera que a través de esta base de datos se brinden criterios sobre la unión específica entre la IgE y el alérgeno (63). Disponible en <http://www.allergen.org/>

### 2.1.3. Software

En el desarrollo de los diferentes análisis *in silico* (simulaciones DM, docking, energías libres, etc.), se han empleado los siguientes softwares:

#### GROMACS 2020.3

El programa GROMACS (64) (GRoningen MACHine for Chemical Simulations) fue desarrollado inicialmente en el departamento de Biofísica y Química de la Universidad de Groningen. Es una suite computacional que, al resolver las ecuaciones de movimiento de Newton, realiza simulaciones de Dinámica molecular en líquidos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. GROMACS es uno de los paquetes más rápidos y populares de software disponibles además de ser de libre acceso y puede ejecutarse tanto en CPUs como en GPUs, lo que incrementa su capacidad de paralelización masiva dándole una gran potencialidad para resolver sistemas cada vez más grandes.

#### TASSER

El nombre del software online I-TASSER (65) (66) del laboratorio ZHANG, proviene del acrónimo *Iterative Threading ASSEmbly Refinement*. Este servidor emplea algoritmos de última generación en secuencias aminoacídicas para el modelamiento de estructuras y predicción de funciones proteicas más precisas. Este servidor usa el método *Threading* empleando las bibliotecas por estructura PDB (67), con la cual se buscan plantillas estructurales de la secuencia dada, ya sea a partir de homólogos o segmentos proteicos reconocidos en la secuencia target. Este paso genera una estructura secundaria predicha a la que se le concede un *confidence score*, graduado del 1 al 9 y el más alto puntaje

indica una mayor confianza de forma que, se pueda estimar la mejor precisión global de los modelos construidos. En base a recopilar restricciones espaciales y a la información evolutiva del modelado, estas predicciones ayudan al programa a identificar plantillas que serán usadas en la construcción de los modelos generados (68),

La calidad de las alineaciones en la plantilla se juzga por el *Z-Score* que se define como la puntuación de energía en unidades de desviación estándar en relación con la media estadística de todas las alineaciones. El servidor provee 5 modelos estructurales de los que se seleccionará un modelo final tomando en cuenta los siguientes puntajes:

- 1) **El factor B o B-Factor:** Esta característica tiene en cuenta que el movimiento térmico y la movilidad de los átomos en las proteínas están estrechamente relacionados con la forma en que la proteína se pliega al estado nativo y su valor indica el grado de movilidad térmica inherente.
- 2) **C-Score:** Es un puntaje de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER. La puntuación está basada en la comparación de las diferentes plantillas, las cuales se alinean en sus diferentes subprocesos de ensamblaje, y en parámetros de convergencia. El rango de puntuación va de -5 a 2, donde el mayor valor significa un modelo con una alta confianza y viceversa.
- 3) **TM-Score:** Es una escala empleada para medir la similitud estructural entre dos estructuras. Al emplear el *TM-Score* se pretende resolver el problema de RMSD que es sensible al error local. Para el análisis del *TM-Score* si el valor obtenido es mayor a 0.5, éste indica que es un modelo de topología correcta.
- 4) **RSQ:** Es la calidad específica del residuo en los modelos, definido como la desviación estimada del residuo en el modelo de la estructura nativa de la proteína. Mientras más alto es el promedio de residuos de calidad, la estructura modelada es de mayor confianza.

El servidor también nos provee la predicción de las funciones proteicas como son la posible unión a distintos ligandos, enzimas y sitios activos, ontología genética, etc. Para acceder a este servidor: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

## ModRefiner

Es un algoritmo de alta resolución a nivel atómico empleado para la construcción y refinamiento estructural de proteínas mediante la minimización energética de las



posiciones atómicas, la cual es llevada a cabo en dos etapas. En la primera, la minimización se realiza sobre los carbonos alfa (*backbone*) de la estructura proteica y es conocida como minimización de baja resolución. En la segunda etapa, se agregan los átomos de las cadenas laterales y el algoritmo aplica una segunda minimización conocida como de alta resolución. La búsqueda conformacional es optimizada por un campo de fuerza compuesto, basado en la física y en parámetros estructurales de proteínas conocidas (69). Es posible acceder a este servidor en <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>

## **PDB2PQR**

Predice los valores de pKa en grupos ionizables de proteínas y complejos proteína-ligando, permitiendo al usuario convertir archivos con extensión “.pdb” en “.pqr”. Los archivos “.pqr” se diferencian de los primeros, en que las columnas de ocupación y factor-B han sido reemplazadas por la información de la carga parcial y el radio de vdW de cada átomo.

Este servidor automatiza muchas de las tareas comunes de preparar estructuras para cálculos electrostáticos continuos, incluida la adición de un número limitado de átomos pesados o faltantes a las estructuras biomoleculares. También estima estados de protonación y biomoléculas protonantes de una manera consistente con la red de enlaces de hidrógeno debidas a las estructuras secundarias. El programa asigna parámetros de carga y radios de vdW, dando opción a elegir desde una variedad de campos de fuerza, para finalmente generar el archivo de salida en formato “.pqr” compatible con varios paquetes bioinformáticos populares. Estos algoritmos permiten facilitar la configuración y ejecución sencilla de cálculos electrostáticos, garantizando a la comunidad biológica un mejor acceso a los análisis electrostáticos continuos de sistemas macromoleculares (70) (71). Disponible en <https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>

## **UCSF Chimera**

Es un programa altamente extensible para la visualización interactiva y el análisis de estructuras moleculares y datos relacionados, los que incluyen mapas de densidad, ensamblajes supramoleculares, alineaciones de secuencias, resultados de acoplamiento, trayectorias y conjuntos conformacionales. Se pueden generar imágenes y animaciones de alta calidad (72). Este programa es de libre acceso y está disponible en <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

## VMD

VMD (73) está diseñado para modelar, visualizar y analizar sistemas biológicos como proteínas, ácidos nucleicos, ensamblajes de bicapas lipídicas, etc. Puede usarse para ver moléculas más generales, ya que VMD puede leer archivos estándar del Protein Data Bank (.pdb). VMD proporciona una amplia variedad de métodos para renderizar y colorear una molécula en forma de puntos y líneas simples, esferas y cilindros (CPK), tubos y cintas helicoidales, entre otros. VMD se puede utilizar para animar y analizar la trayectoria de una simulación de DM. Este programa puede descargarse previo a un registro en la página de la Universidad de Illinois <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/allversions/vmd.bib>

## MolProbity

Es un servicio web de validación de estructura que proporciona una evaluación de amplio espectro y sólida de la calidad del modelo, tanto a nivel global como local, para proteínas y ácidos nucleicos. Se basa en gran medida en la potencia y la sensibilidad proporcionadas por la colocación optimizada de los hidrógenos y el análisis de contacto de todos los átomos, complementado con versiones actualizadas de los criterios de geometría covalente y ángulo de torsión. Los resultados pueden ser analizados al observar los diagramas de Ramachandran (74). Disponible en <http://molprobity.biochem.duke.edu/>

## GaussView 6

GaussView 6 es una interfaz gráfica, que permite construir o importar estructuras moleculares de interés. También incluyen nuevas características creadas en las que trabajar con grandes sistemas sea adecuado y sencillo, como monitorear y controlar los cálculos cuánticos. Para finalmente ver los resultados predichos gráficamente (75).

## ElliPro: Antibody Epitope Prediction

Es una herramienta web que permite al usuario analizar porciones de las estructuras proteicas de los antígenos con la finalidad de predecir y visualizar sus epítomos continuos y discontinuos de éstos. El método que emplea está basado en las propiedades geométricas estructurales y en la secuencia aminoacídica de la proteína.

ElliPro aplica tres algoritmos para hacer esta predicción: Primero se aproxima la forma de la proteína como un elipsoide, luego se calcula el índice de protrusión (PI) de residuos, el cual es una escala numérica que entre menor sea el valor mayor reconocimiento existirá. Finalmente, hará un agrupamiento de residuos vecinos en base a sus valores de PI (76). El servidor mostrará los resultados divididos entre epítomos continuos (residuos



secuenciales) y epítomos discontinuos (residuos en una región). Para acceder a ElliPro puede visitar su página web: <http://tools.iedb.org/ellipro/>

### **PatchDock**

Es un nuevo algoritmo para el acoplamiento rígido de moléculas no ligadas entre sí, ya sea proteína-proteína o proteína-droga. Este algoritmo está basado en la técnica *Computer Vision* la cual es usada para el reconocimiento de objetos empleando técnicas de segmentación de imágenes. Así se asegura una amplia interfaz para incluir varias características locales que se corresponden entre las moléculas acopladas y que tienen propiedades complementarias, es decir, PatchDock basa sus resultados en la complementariedad geométrica. Teniendo dos moléculas, sus superficies se dividen en parches geométricos de acuerdo a la forma de la superficie, éstos son agrupados como piezas de rompecabezas, es decir, una vez que se identifican los parches se pueden superponer utilizando algoritmos de coincidencia de formas obteniéndose modelos que serán evaluados mediante un RMSD del complejo proteína ligando (77). Disponible en <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/php.php>

### **FireDock**

A diferencia del servidor anterior, es un método realizado para el refinamiento de alto rendimiento en un acoplamiento flexible, que proporciona una lista de soluciones refinadas, ordenados en función a la energía de interacción y una visualización en 3D para observar y compararlos entre ellos. El servidor PatchDock ofrece a los usuarios un re-direccionamiento para que los mejores modelos obtenidos por un acoplamiento basado en la complementariedad (hasta un máximo de 1000 modelos) sean refinados de manera local por FireDock (78).

Disponible en: <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/php.php>

### **LigPlot**

El programa LigPlot es empleado para la determinación estructural de las interacciones del complejo proteína-ligando. El análisis de los gráficos 2D a partir de coordenadas 3D de estructuras que representan estos complejos, proporcionará una amplia interpretación de dichas interacciones, ya que permite una visualización de las interacciones electrostáticas como son los puentes de hidrógeno y de los contactos hidrófobos entre el ligando y los elementos de las cadenas principal y/o lateral de la proteína (79).



## PDBSum

El servidor PDBsum proporciona información estructural sobre los archivos de entrada en el formato del Protein Data Bank (.pdb). Los análisis constan principalmente en imágenes e incluyen estructura secundaria de proteínas, dominios proteicos, análisis Ramachandran e interacciones proteína-ligando. Otros servidores o programas relacionados a este servidor para la visualización interactiva de estructuras 3D son RasMol, PyMOL y un visor de JavaScript llamado 3Dmol.js (80). Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>

## MM-PBSA

Es un método utilizado para estimar las energías libres de interacción ( $\Delta G_{\text{inter}}$ ), que son aprovechadas actualmente en el estudio de interacciones biomoleculares. Para la obtención de estas energías, se ha utilizado el programa `g_mmpbsa` el cual es integrado dentro del paquete de GROMACS para leer las trayectorias de las simulaciones y que utiliza la metodología APBS para su cálculo.

La información de salida obtenida por medio de esta herramienta es utilizada como entrada en los diferentes scripts escritos en lenguaje Python y que son proporcionados en el mismo paquete de `g_mmpbsa`. Cada uno de estos scripts son usados para obtener de forma más comprensible la energía de interacción final y la contribución energética de cada residuo en el acoplamiento molecular (81). La energía de interacción está compuesta por varios términos energéticos como son la energía potencial de mecánica molecular (EMM), la energía libre de solvatación la cual comprende la energía polar y la no polar. Esta última pudiéndose calcular en base a distintos modelos por ejemplo por medio de la superficie accesible al solvente (SASA), volumen accesible al solvente (SAV). Disponible en: [https://rashmikumari.github.io/g\\_mmpbsa/](https://rashmikumari.github.io/g_mmpbsa/)

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Búsqueda de la estructura

En el presente trabajo de investigación se utilizaron las bases de datos NCBI (61), WHO/IUIS *Allergen Nomenclature* y UniProt. El NCBI proporcionó información sobre los tipos de polcalcinas que el polen del maíz contiene. Se eligió la *Jun o 2*, tomando la estructura primaria en el formato fasta para el posterior modelamiento. En la base de datos *Allergen Nomenclature*, se corroboró la existencia de esta polcalcina como un nuevo aeroalérgeno, además de su origen y clasificación. La página ofrece un enlace con la base

de datos UniProt donde se encontró información detallada de la polcalcina.

UniProt proporcionó datos estructurales como la cantidad y el número del intervalo de residuos en el bucle donde se ubican los iones de calcio y las zonas que corresponden a las  $\alpha$ -hélices. En este servidor se puede encontrar información adicional como la clasificación taxonómica, el peso molecular, cantidad de aminoácidos y referencias bibliográficas de investigaciones ya hechas.

### 2.2.1.1. Modelamiento de la Polcalcina

La estructura cristalizada de la polcalcina *Jun o 2* no está registrada en las bases de datos PDB (67), UniProt (46) o AllergenGenome (63), a pesar de que ya se cuente con la secuencia de aminoácidos en formato fasta. Por lo cual para obtener su estructura tridimensional se realizó un modelamiento utilizando el servidor I-TASSER que emplea la técnica de *Threading*.

Este servidor se basa en superponer la secuencia problema sobre la estructura de diferentes proteínas, cuyo plegamiento estructural es conocido, y evalúa la diferencia de estructuras por medio de un match o emparejamiento de estructuras para cada superposición (65) (66). Este servidor proporciona cinco posibles modelos candidatos con diferentes puntajes. La elección se realiza analizando el puntaje o score (C-score, TM-score, RMSD, RESQ) de cada modelo.

El método de *threading* alinea la secuencia de nuestra proteína diana o target al modelo estructural creado a partir de distintas estructuras conocidas en la biblioteca o base de datos. Con éste se construye un modelo aproximado de la proteína y se generan diferentes alineamientos de secuencia posibles para encontrar el mejor modelo (55). Para completar la estructura, I-TASSER usa plantillas para insertar moldes de otras estructuras homólogas para llenar los lugares de la secuencia principal que no concuerdan con la estructura modelo.

### 2.2.2. Refinamiento del Modelado

El servidor MODREFINER es empleado para el refinamiento de las estructuras proteicas por medio de minimizaciones energéticas. Una vez ingresado al servidor, existe la opción de subir un archivo en formato .pdb, en este caso se ingresó el archivo del mejor modelo de la *Jun o 2* obtenido por el I-TASSER, obteniéndose una estructura refinada de la misma, es decir se realiza una optimización estructural para su posterior empleo en la DM.



A pesar que estos programas han sido de gran utilidad para el modelamiento y refinamiento de la estructura de esta polcalcina, debido a su precisión y optimización estructural, un problema es que no se reconocen otros residuos que no sean aminoácidos. Por lo tanto, los iones calcio, que son característicos de las polcalcinas, no fueron considerados dentro del modelamiento, debido a ello, se tuvo que agregar manualmente (Gauss View) estos heteroátomos.

### 2.2.3. Acondicionamiento del Calcio

El empleo del software Gauss View permitió la adición de los calcios en las zonas carboxílicas tomando en cuenta los aminoácidos que enlazan al calcio (Asp, Glu, His, Gly). La posición de los calcios fue empleada en referencia a la estructura de la polcalcina del maíz *Phl p 7* y por la base de datos UniProt (46).

Al realizar la ubicación de los calcios, se tuvo en cuenta la distancia y posición entre el calcio y los aminoácidos que lo rodean, así como la distancia que tienen los átomos de Ca entre sí. Como prueba de que este método era correcto, se realizó una simulación corta de 5ns, que contaba solo con la adición de un átomo de calcio, para confirmar la estabilidad y permanencia en la estructura.

Al confirmar la estabilidad del bucle unido al calcio, se continuó agregando los iones calcio restantes a la estructura. Finalmente, con la estructura completa, se realizó una simulación de DM de 5ns centrando al sistema en una caja cúbica, procurando asegurar una distancia entre la polcalcina y las paredes de la caja de 1.5nm, con el fin de minimizar energéticamente la interacción proteína - calcio. Así se logró confirmar la estabilidad total de los calcios en la polcalcina modelada.

### 2.2.4. Acondicionamiento de pH

Para el estudio del pH se empleó el servidor PDB2PQR (70) (71), el cual proporcionó una predicción de los cambios de las constantes de acidez ( $pK_{\alpha}$ ) en cada uno de los residuos que constituyen la Jun o 2 a los siguientes: 5, 6 y 7. La estructura modelada de la polcalcina, se ingresó al servidor y se empleó el *forcefield* AMBER para calcular la carga total de la proteína y nombrar los estados de protonación para los residuos, según el pH con el que se quiera trabajar.

Finalmente se descargó el archivo “.pqr” el cual, a diferencia de un formato “.pdb”, contiene en las dos últimas columnas la carga y el radio de cada átomo. A partir de este archivo se crearon tablas con la información sobre los estados de protonación y



carga total de los residuos susceptibles a protonar (Asp, Glu, His) que se declararán en la construcción de la topología de cada pH.

### 2.2.5. Evaluación de la Protonación en GROMACS

Para evaluar el pH neutro de un sistema construido por GROMACS sin declaración de residuos protonados y un sistema con declaración de residuos por el método de PROPKA, se generaron dos simulaciones de estos dos sistemas identificados como DG para el primer caso y PG para el segundo.

Para construir las topologías con el comando `pdb2gmx`, en el primer sistema no se declaró los residuos ácidos (Asp, Glu) y básico (His). Para el segundo sistema éstos sí fueron declarados con la protonación correspondiente a un pH 7 obtenido por PROPKA.

Ambas simulaciones fueron realizadas con el campo de fuerza OPLS-AA (82). En una caja cúbica de 1.5 nm de distancia entre el último residuo de la polcalcina hacia las paredes de la caja, en un modelo de agua TIP4P y neutralizada con iones de  $\text{Na}^+$ . Llevadas al equilibrio por medio de dos ensambles, uno canónico (NVT) y otro isotérmico-isobárico (NPT) ambos a 50ps, con temperatura de 309.65K y 1 bar de presión. Ambas simulaciones se realizaron en un tiempo de 100ns.

Se evaluó el RMSD, RMSF, radio de giro y enlaces de hidrógeno. También se comparó la estructura final entre estas simulaciones empleando el programa Chimera con su herramienta “MatchMaker”, midiendo el RMSD de las dos estructuras finales.

### 2.2.6. Evaluación de los pH 5 y 6

Después del refinamiento se utilizó el programa GROMACS v. 2020.3 para las simulaciones con el campo de fuerza OPLS-AA (82). Una vez realizada la simulación a pH neutro (7) la polcalcina *Jun o 2* fue sometida a otras condiciones de pH (5 y 6) a fin de evaluar el efecto del pH sobre la polcalcina en condiciones de estrés fisiológico.

Para asegurar las mismas condiciones de simulación la polcalcina se centró dentro de una caja cúbica con una distancia de 1.5 nm entre la proteína y las paredes de la caja. Mediante la utilidad `pdb2gmx` además de obtenerse la topología y las coordenadas de la proteína, ofrece la opción de declarar residuos susceptibles a protonación como son los residuos ácidos (Asp, Glu) y básicos (His). Un paso importante en la declaración de residuos es verificar que la carga total de sistema concuerde con la carga total que se obtiene con la metodología del PROPKA. Una vez obtenida la topología del sistema, éste fue solvatado utilizando el modelo de agua TIP4P (83). Para mantener al sistema

eléctricamente neutro, se añadieron los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  según la carga neta total obtenida en cada pH. Con el sistema neutro, se procedió a realizar una minimización de energía, permitiendo la relajación de la estructura del sistema para evitar choques estéricos o cualquier otra irregularidad.

A ambos sistemas (pH 5 y 6) se les realizó un equilibrio usando simulaciones en los ensambles NVT y NPT a las mismas condiciones que a pH neutro. La DM conocida como de “producción” fue realizada a 100ns a una temperatura corporal de 309.65 K y a 1 bar de presión. Finalmente, para evitar problemas de periodicidad en los sistemas, se realizó un ajuste a las trayectorias de las simulaciones mediante el comando `trjconv` a partir de la cual se obtuvo la trayectoria final de los 100ns.

Para analizar las propiedades de estabilidad estructural se utilizaron los siguientes indicadores: RMSD, RMSF, radio de giro, enlaces de hidrógeno, los cuales se detallan a continuación.

- 1) **RMSD:** Es la medición de la desviación cuadrática media. Indica cuánto cambia la estructura respecto a una de referencia, normalmente la estructura en su estado cristalizado o inicial de la simulación. Para obtener su valor se calculan las distancias promedio entre átomos de los residuos que conforman la proteína. Expresada en unidades de longitud de angström (Å) (84) o nanómetros, se emplea como una medida cuantitativa de similitud entre 2 o más estructuras de proteínas. Con el RMSD se pueden estudiar el plegamiento de proteínas mediante intervalos de las trayectorias entre el estado plegado y desplegado, también es usado en el contexto de acoplamiento proteína-ligando. El programa GROMACS lo calcula mediante el comando `gmx rms`, donde compara la estructura inicial con todas aquellas que se van generando durante la trayectoria de simulación las cuales se encuentran en los archivos “.xtc/.trr”. La ecuación utilizada para su cálculo es la siguiente (85).

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.1)$$

Donde M es la masa total del sistema calculada mediante la ecuación  $M = \sum_{i=1}^N m_i$ .  $r_i(t)$  es la posición del átomo i en el tiempo t y N es el número de átomos.

- 2) **RMSF:** Calcula la fluctuación cuadrática media de raíz. Es una medida de la flexibilidad o los cambios de las posiciones debidas a las fluctuaciones de los átomos durante la trayectoria total de simulación. Al igual que en el RMSD, GROMACS calcula este indicador mediante el comando `gmx rmsf` con los archivos de



trayectoria y referencia (85).

$$RMSF(t_1, t_2) = \frac{1}{N} \sum_T \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \quad (2.2)$$

Donde  $T$  es el tiempo total de la simulación,  $r_i(t)$  es la posición del átomo  $i$  en el tiempo  $t$  y  $N$  es el número de átomos. (86)

- 3) **HBOND:** Este análisis calcula los enlaces de hidrógeno existentes entre dos grupos de átomos (que deben ser idénticos o no superpuestos) o en tripletes de donador-aceptor de hidrógeno específicos (85). Empleamos este análisis para evaluar la estabilidad estructural después del modelamiento y en cada una de las condiciones requeridas. En GROMACS se emplea el comando `gmx hbond`.

Para la existencia de los enlaces de hidrógeno se tuvieron en cuenta dos parámetros: la distancia de 0.35nm y el ángulo de 30° entre los átomos electronegativos.

- 4) **Radio de giro (RG):** El radio de giro de una proteína es una medida de su compactación. Si una proteína se pliega, es probable que disminuya su valor mientras que si se despliega este valor aumentará. Se calcula el radio de giro mediante la siguiente ecuación:

$$Rg = \left( \frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.3)$$

donde  $m_i$  es la masa del átomo  $i$  y  $r_i$  es su posición con respecto al centro de masa en la molécula. El comando en GROMACS `gmx gyrate`, calcula el radio de giro en una molécula y los radios de giro alrededor de los ejes x, y, z en función del tiempo. Los átomos están explícitamente ponderados en masa (85). Una forma simplificada de la ecuación anterior es la siguiente:

$$R_g^2 = \frac{1}{M} \sum_i m_i (r_i - R_c)^2 \quad (2.4)$$

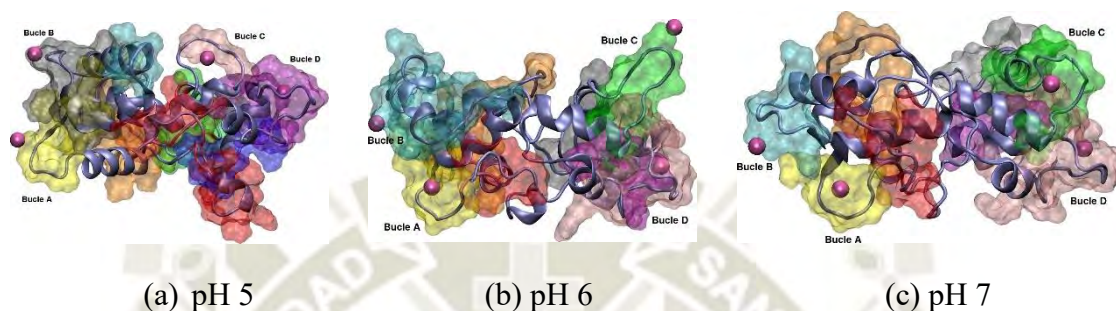
Donde  $M$  es la masa total de la proteína,  $m_i$  es la masa del átomo  $i$  y  $R_c$  el centro de masa.

### 2.2.7. Predicción de los epítomos

Es fundamental conocer la predicción de los epítomos de la polcalcina *Jun o 2* en los distintos pH para desarrollar una mejor respuesta antigénica y que éste represente los posibles sitios en los que ha de realizar el acoplamiento molecular de forma natural. Empleando la base de datos de epítomos inmunes (IEDB) por medio de la herramienta de



análisis ElliPro, el cual hace una predicción de epítomos que sean reconocidos por los anticuerpos. Una vez ingresado el “.pdb” de las estructuras a distinto pH (estabilizadas por DM), ElliPro proporciona la información tanto de epítomos continuos como discontinuos ordenados de acuerdo a su porcentaje de probabilidad. Esta información será empleada para la elección de las posibles soluciones que se obtendrán con los servidores de acoplamiento.



**Figura 2.1:** Representación coloreada en base al orden secuencial en la estructura de la polcalcina a los distintos pH estudiados, el código empleado ordenados es rojo, naranja, amarillo, cian, gris, verde, rosa, morado y azul. Fuente propia.

### 2.2.8. Acondicionamiento de la Inmunoglobulina E

Para la construcción de la IgE, se utilizó la estructura con el código 5OTJ obtenida del *Protein Data Bank* (87). El complejo IgE-polcalcina está conformado por dos regiones Fab de dos IgE distintas unidas a dos monómeros de polcalcinas *Phl p 7*. En este estudio y utilizando el programa Chimera, se eliminaron las dos polcalcinas y solo se empleó una de las regiones Fab.

Haciendo un análisis estructural se observó que existían átomos o residuos perdidos sobre todo para residuos de histidina, por lo que se tuvo que completar la estructura usando herramientas de Chimera. Para su refinamiento, la estructura de la IgE fue enviada al servidor ModRefiner y para asegurar una conformación estable, se realizó una minimización energética para que esté dentro de su forma natural.

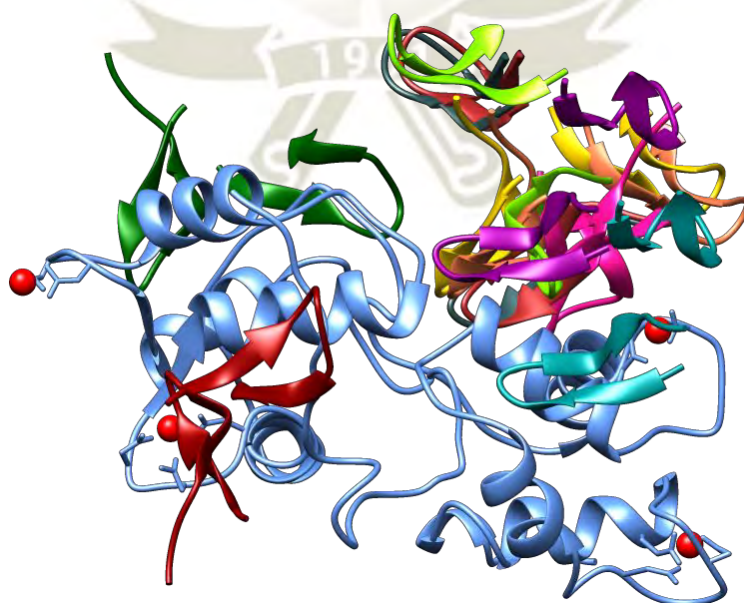
Finalmente, con la estructura refinada de la inmunoglobulina, se usó el programa PDB2PQR, para hallar el grado de protonación de su estructura a los pH a evaluar. Se registró la carga total y la protonación de los residuos ácidos (Asp y Glu) y básico (His).

### 2.2.9. Docking entre la Polcalcina y la IgE

El acoplamiento se realizó empleando el servidor PatchDock, donde se ingresaron las estructuras. Haciendo uso de la opción antígeno-anticuerpo para el acoplamiento, se empleó como receptor (anticuerpo), a la IgE mientras que para el ligando (antígeno) a la

polcalcina. Una vez realizado el cálculo se obtuvieron los complejos solución en un modelo rígido y PatchDock proporcionó un enlace web para su consulta. Posteriormente, en base a estas soluciones se llevó a cabo una nueva predicción con el servidor FireDock que es una nueva alternativa dada por PatchDock, que es una versión para refinar los resultados en base a sus energías y movimiento de los rotámeros en la estructura.

Se descargó el archivo comprimido que contiene las 10 mejores soluciones de referencia. Para elegir las soluciones que se utilizarán más adelante en la DM, se tuvo en cuenta algunos términos energéticos que utiliza el servidor como son las energías globales, de repulsión/ atracción de van der Waals ( $aVdW$  /  $rVdW$ ), las energías electrostáticas de corto y largo alcance ( $aElec$  /  $laElec$ ) y el ACE (*Atomic Contact Energy*). Otra característica tomada en cuenta fue el nivel de acoplamiento entre ambas estructuras (penetración o inserción IgE - polcalcina), estos datos están organizados dentro de una tabla por cada pH (Tablas A.39, A.50, A.61 del Apéndice). Para la elección de los complejos que serían simulados, se usó un programa escrito en lenguaje Fortran (Apéndice A.9), el cual permitió la visualización exclusiva de los CDRs del antígeno con respecto a la polcalcina Jun o 2. Primero se consideró que las estructuras se encontraran agrupadas en una zona, además de que el CDR de ambas cadenas deberían estar interaccionando con una zona que pertenece a un epítipo de la polcalcina (Tablas del Apéndice A.33, A.35, A.37). Una vez reconocido el lugar con mayor probabilidad de interacción, se eligieron las dos mejores soluciones en base a sus características energéticas.



**Figura 2.2:** Interacción de los complejos polcalcina-IgE. En la figura solo se muestra el CDR de la IgE coloreado de las 10 mejores soluciones predichas del acoplamiento molecular (docking). La polcalcina se muestra en color azul-celeste y los calcio en rojo. Fuente propia.



El proceso anteriormente escrito se realizó para cada pH empleado en este estudio. Empleando CHIMERA se les cambió el ID de la cadena numerándolas como se muestra en la Tabla 2.1, el cual será utilizado en la descripción de los resultados.

**Tabla 2.1:** Nueva numeración de las cadenas.

TIPO	ID CADENA
<b>Polcalcina Jun o 2</b>	A y B
<b>IgE Cadena A</b>	C
<b>IgE Cadena B</b>	D

De las soluciones seleccionadas, se les realizó una simulación de DM, declarando el estado de protonación en los residuos de la polcalcina e inmunoglobulina y se verificó que la carga final obtenida en la topología sea correcta. Para el sistema se definió una caja de 1.8nm de distancia con respecto de los átomos más lejanos estructuralmente que tienen los complejos antígeno-anticuerpo hacia las paredes de la caja. En un medio solvatado (TIP4P) y eléctricamente neutro (adición de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ), la simulación se llevó a cabo dentro en un periodo de 100 ns a 309.65 K.

Al finalizar estas dinámicas y evitar problemas por las condiciones periódicas, se corrigieron las trayectorias de simulación empleando el comando `trjconv` con la opción de `-fit rot+trans`. Este permitió que la proteína permaneciera dentro de la caja del sistema al impedir los movimientos de rotación y traslación de los diferentes complejos moleculares.

### 2.2.10. Análisis del Dockeo o Acoplamiento molecular

Para el análisis de cada sistema se calcularon en GROMACS las gráficas de RMSD, RMSF, Radio de Giro y cantidad de enlaces de Hidrógeno.

Se empleó el programa Ligplot<sup>+</sup>, para visualizar las interacciones entre la IgE y polcalcina, se ingresó el .pdb de la estructura del complejo estabilizado al programa y se especificaron los dominios del CDR en la IgE para obtener las interacciones con la polcalcina.

Otra herramienta usada para el análisis de las interacciones fue la aplicación de PDBSum, el cual permite la identificación de los cambios estructurales. Al igual que en Ligplot<sup>+</sup>, PDBSum provee las interacciones que hay en el complejo antígeno- anticuerpo y clasifica cualitativamente el tipo y la intensidad o fuerza de dichas interacciones.



### 2.2.11. Estimación de las energías libres de interacción ( $\Delta G_1$ )

Dentro del reconocimiento de las interacciones de acoplamiento o Docking, el método MM-PBSA es empleado para evaluar la estabilidad de los complejos moleculares mediante el cálculo de las energías enlazantes.

Para hacer el cálculo de estas energías se empleó el programa GROMACS versión 2020.3, con los archivos de trayectoria “. tpr” y “. xtc” para uno de los sistemas simulados. Este cálculo requiere de un archivo que contenga cada uno de los grupos a los que se quiera realizar el cálculo de las energías de interacción (.ndx) y un archivo que contenga las diferentes rutinas para calcular la energía libre de solvatación (. mdp). De esta forma se obtendrán diferentes términos energéticos correspondientes a la interacción MM-PBSA como: la energía potencial en el vacío, energía de solvatación polar y energía de solvatación no polar (81).

Se usó la metodología g\_mmpbsa para obtener estas energías, el cual provee subrutinas y/o scripts para realizar este cálculo y los comandos necesarios para efectuar el análisis correspondiente en base a la energía generada en un rango de tiempo donde la simulación se encuentra en equilibrio o ha entrado a una convergencia con base a los gráficos RMSD analizados previamente.

Los análisis de esta estimación son evaluados en gráficas de coordenadas (. xvg) y el archivo “.pdb” con las interacciones de la contribución energética del complejo puede visualizarse con el programa VMD. ‘

# CAPÍTULO III

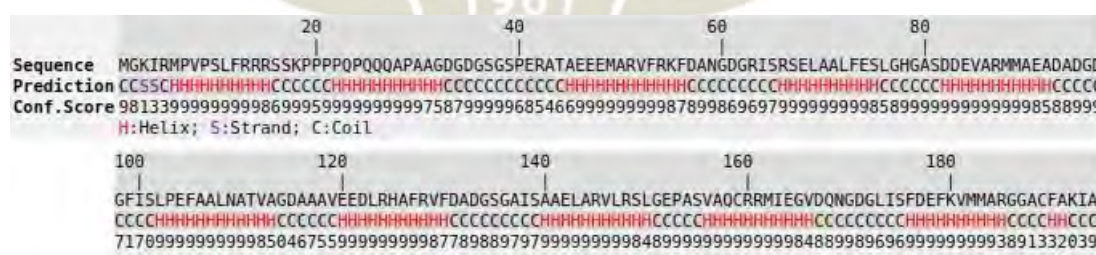
## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Obtención de la Estructura

#### 3.1.1. Modelamiento de la Polcalcina

Se efectuó la búsqueda estructural de la proteína *Jun o 2* en diversas bases de datos (NCBI, PDB, Allergen Nomenclature, UniProt), por tanto, se pudo constatar que faltaba información sobre esta proteína así que se procedió a construirla empleando el servidor I-TASSER. Como se mencionó anteriormente, este servidor realiza modelaciones conformacionales en proteínas, basado en algoritmos de tipo *Threading*. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que este programa está optimizado para trabajar con residuos proteicos por lo que los calcios fueron añadidos más adelante.

En la Figura 3.1 se observan numerosos residuos con un alto Conf. Score (igual a 9). Además, se muestra una distribución y predicción sobre la disposición secundaria de la polcalcina, como la formación de  $\alpha$ -Hélices (H),  $\beta$ -Strand (S) y Coil (C).



**Figura 3.1** Distribución de los residuos en la estructura secundaria predicha.  
Imagen obtenida del servidor I-TASSER.

En la gráfica del factor-B predicho (Figura A.1), se observan valores negativos, lo que significa la relativa estabilidad estructural. Este factor toma en cuenta la interacción en las regiones específicas en las que los ligandos se unen a la proteína (7) (88), por lo que esta gráfica será significativa para la modelación posterior, así mejorar el reemplazo molecular. Usando LOMETS (89), un programa de *Meta-Threading*, que



consiste en múltiples algoritmos de *Threading* (66), nos brindó óptimos homólogos que cumplieran con las pruebas ya realizadas anteriormente. En la Tabla A.1 se puede observar que el homólogo N7 tiene un alto *Z-Score* ( $3.40 > 1$ ), de esta manera se puede deducir que este modelo de proteína es un mejor *Target* o diana. La zona de los alineamientos está organizada de forma que la primera tiene más regiones conservadas y ésta tiene una alta precisión en la configuración (Figura A.2).

En la Tabla 3.1 se muestran los puntajes del *C-Score* y ResQ de los 5 modelos que nos proporciona el servidor I-TASSER. Ya que el Modelo 1 presenta mejores puntajes: *C-score* (-2.38, más cercano a uno) y ResQ (1596 mayor número de plantillas empleadas). Además, los valores del *TM-Score* ( $0.39 \pm 0.13$ ) y RMSD ( $11.8 \pm 4.5$ ) nos indican que la optimización fue exitosa (90), es por ello que se escogió este modelo conformacional para la polcalcina *Jun* o 2.

**Tabla 3.1:** Puntajes de los modelos obtenidos por I-TASSER. Para el modelo 1, se muestra los valores de *TM-score* y RMSD debido a que es la estructura con mejor precisión en el modelamiento.

Modelo	C-Score	TM-Score	RMSD	ResQ
1	-2.38	$0.39 \pm 0.13$	$11.8 \pm 4.5$	1596
2	-2.93			1480
3	-3.04			974
4	-3.43			851
5	-3.58			807

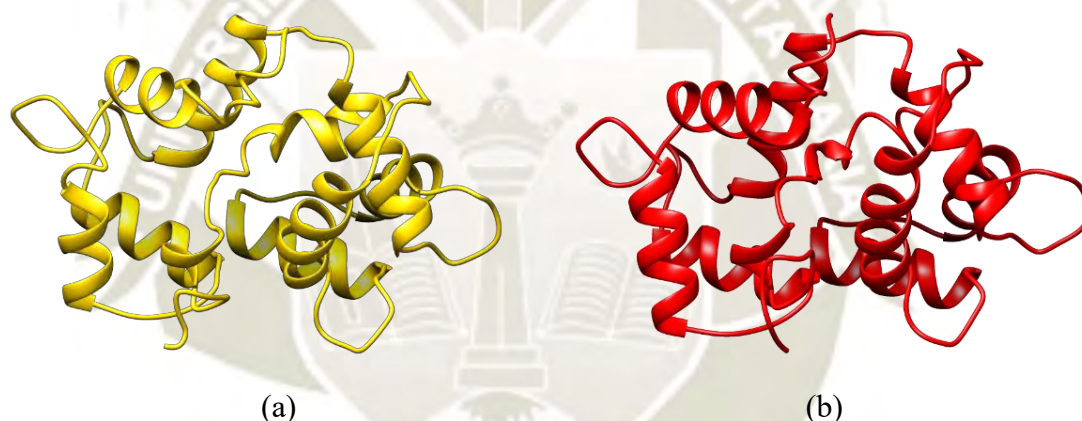
Los valores de la columna ResQ de la tabla anterior representan el número de Decoys estructurales (88), que se utilizaron para generar cada modelo el cual, como puede observarse, es mayor en el primer modelo. Esto significa que una mayor densidad de Clusters en la configuración se producen con mayor frecuencia en la trayectoria de simulación y, por lo tanto, genera un modelo de mejor calidad. A partir de éstos se elaboró la Figura A.3 para el Modelo 1, en la cual la línea de precisión estimada tiene menor fluctuación, lo que nos da una mejor calidad de alineamiento.

Los datos obtenidos por el servidor nos ofrecen una predicción de la función para nuestro primer modelo como los sitios de unión a un ligando. En la Tabla del Apéndice A.2 podemos observar el C-score, tamaño del clúster, el PDB del homólogo respectivo, los ligandos y residuos del sitio de unión.



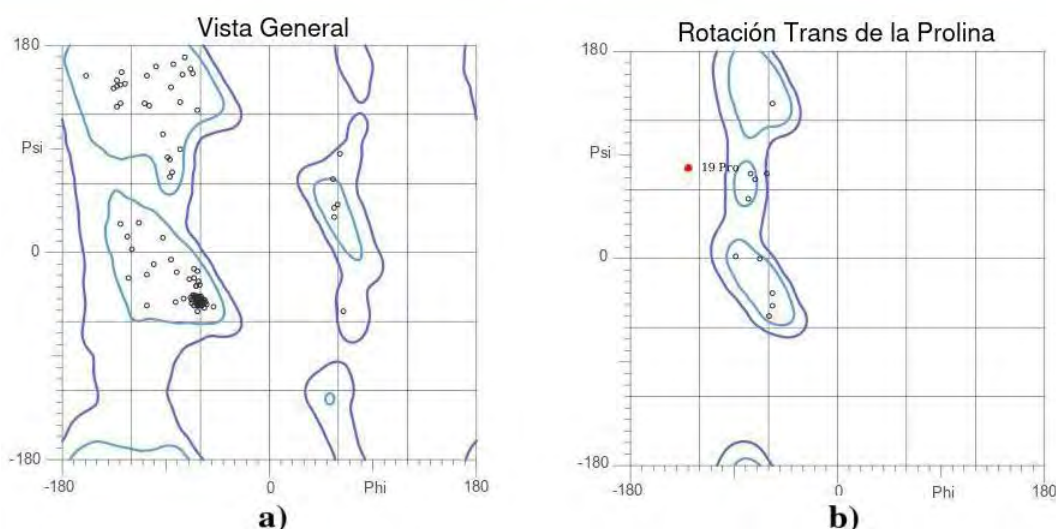
A partir de esta tabla nos interesa exclusivamente los sitios de unión al calcio. Contrastando con la base de datos UniProt, los sitios dados para el calcio son cuatro y los residuos que lo conforman están dentro del rango registrado en dicha base de datos. Sin embargo, los resultados obtenidos en el servidor I-TASSER sólo nos proporcionan dos sitios de unión. Estos lugares de unión al calcio tienen un alto C-score de 0.8 en ambos casos considerados como un alto puntaje de confianza dentro del rango 0 a 1. Esta información se tomó en consideración para el posterior acondicionamiento de los calcios.

Se observa en la Figura 3.2(a) el Modelo 1, escogido entre los 5 modelos que nos ha proporcionado I-TASSER y cuya elección estuvo basada en los análisis anteriormente mencionados. Finalmente, para el modelo seleccionado se realizó un refinamiento (Figura 3.2(b)) en el servidor ModRefiner, éste se encarga de optimizar las posiciones atómicas mediante minimizaciones energéticas.



**Figura 3.2:** Representación 3D de la estructura de la polcalcina *Jun o 2* obtenidas después del modelado. (a) Modelo 1 obtenido en I-TASSER y (b) Refinamiento por ModRefiner. Ambas conformaciones carecen del calcio.

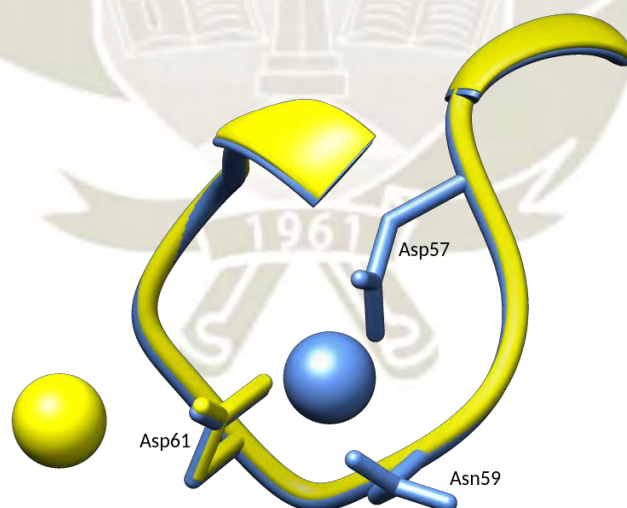
La validación del refinamiento de la conformación obtenida fue mediante la gráfica de Ramachandran, en base a una graduación del 100 %. La Figura 3.3(a) registra que el 96.9 % de los residuos están en una región favorecida y el 99.5 % dentro de una región permitida. Solo un residuo se encontró fuera de estas regiones (Pro19), representada por un punto rojo (Figura 3.3(b)) (74) (91).



**Figura 3.3:** Gráfica de Ramachandran. (a) Residuos en regiones favorecidas (celeste) y permitidas (azul) de la polcalcina Jun o 2. (b) Región Trans de prolinas donde se observa que la Pro19 no se encuentra dentro de la zona. Obtenido del servidor MolProbit.

### 3.1.2. Acondicionamiento del Calcio

El acondicionamiento o adición de los calcio en la proteína refinada de la polcalcina fue realizada utilizando el programa Gauss View, teniendo en cuenta la posición dentro del bucle según la información obtenida del servidor UniProt. Los resultados muestran que el calcio no solo permaneció en el bucle, sino que también se acomodó en él como muestra la Figura 3.4.

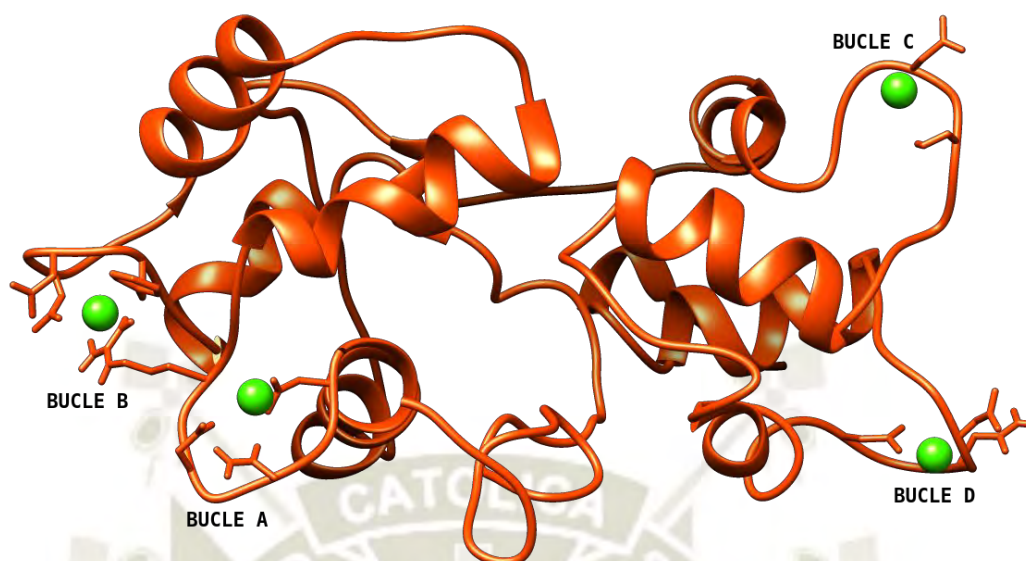


**Figura 3.4:** Adición del Ca en el Modelo 1 refinado. Amarillo: Primer Calcio adicionado, Celeste: Después de la dinámica a 5ns. Fuente propia.

En base al resultado anterior, la adición de los calcio restantes en sus respectivos bucles, se realizó siguiendo la misma metodología, por lo que se obtuvo el reposicionamiento y permanencia de cada uno en el bucle respectivo, obteniendo la estructura final de la polcalcina *Jun o 2* que fue con la que se trabajó en los análisis



subsecuentes, tal como se observa en la Figura 3.5.



**Figura 3.5:** Estructura Final de la Polcalcina Jun o 2 obtenida a 5ns de DM. Fuente propia.

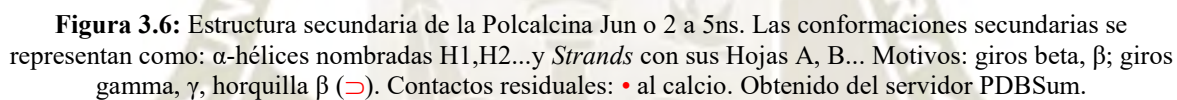
### 3.1.3. Caracterización de la Polcalcina

Usando el servidor PDBSum y la estructura final modelada se hizo un análisis de las conformaciones secundarias Figura 3.6, se observó la formación de 12  $\alpha$ - hélices, de las cuales cinco le dan la estabilidad e inician el bucle que contiene al calcio. Los sitios de unión al calcio dentro de la secuencia están representados como "XX". También se señala los residuos donde el calcio se une a la proteína por la representación de un punto rojo (•) en la Figura. La Tabla 3.2 contiene el resumen de la configuración final obtenida después del refinamiento y adición de los calcios.

**Tabla 3.2:** Resumen de estructuras secundarias del modelado final de la polcalcina.

Strand			Hélice	Giro		Resid. Total	Ligando
$\beta$ Strand	Hoja	Horquilla $\beta$	$\alpha$ Hélice	Interac.Helices	$\beta$	$\gamma$	
2	1	1	12	13	23	1	194 aa 4 $\text{Ca}^{+2}$



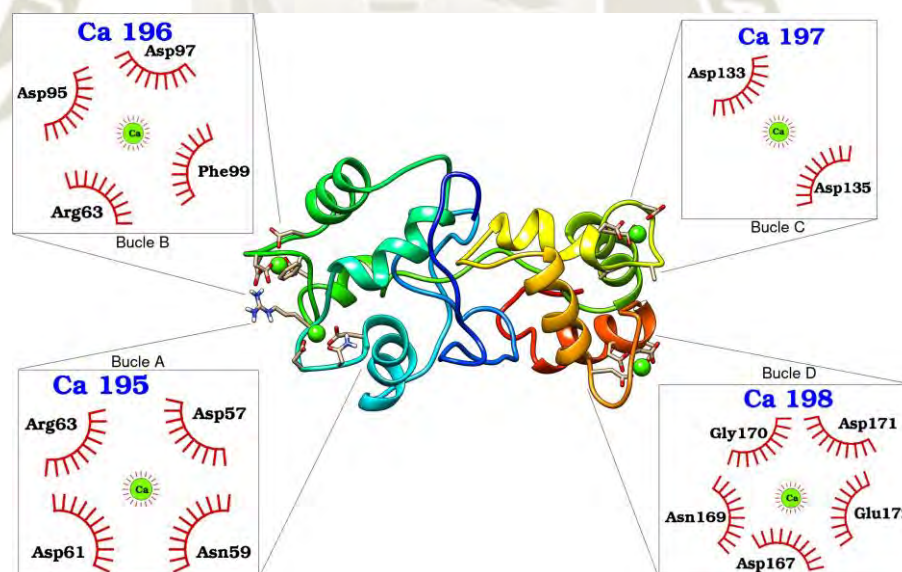


Se sabe que las horquillas o *hairpin* se han formado por la conformación de dos  $\beta$ -strand que son antiparalelas y están unidas por enlaces de hidrógeno (93). En la Figura 3.6 se ubica la horquilla formada por las dos *strands* o hebras entre los residuos Ile138 hasta Leu174. El tipo de horquilla indica la cantidad de residuos que se ha empleado, además se observa que no se ha formado el enlace de hidrógeno (Tabla A.4).

Los datos presentados en la Tabla A.6, engloba para cada  $\alpha$ -hélice el número de secuencia a la que pertenece, comenzando con la primera cerca el extremo N-terminal de

la polcalcina. La tabla menciona el residuo correspondiente al inicio y final de la secuencia para cada hélice; continúa definiendo a la clase que puede pertenecer:  $\alpha$  (H) o del tipo  $3_{10}$  (G), registrando una mayor cantidad de la variedad  $\alpha$ -hélice, característica que le confiere a nuestra una mejor estabilidad estructural (94), la cual está en relación con la presencia de estas dos configuraciones. Debido a que este dipolo de hélice proporciona interacciones electrostáticas importantes para la alineación antiparalela de hélices en proteínas (95) (96), observadas dentro de las conformaciones en los motivos EF-hand de las proteínas unidas a calcio, grupo al que pertenecen las polcalcinas (97). También señalar que la hélice 10, es del tipo  $3_{10}$  debido a que su conformación es precedida por dos giros  $\beta$  (94) (95). Finalmente, la última columna de la tabla muestra la secuencia de aminoácidos en la hélice correspondiente.

El servidor PDBSum ha suministrado información adicional de las interacciones entre hélices, las cuales proporcionan a la estructura una forma de barril y la formación de los dominios EF-hand típicos de las polcalcinas. Además, conformaciones como los giros  $\beta$  son representativos para la formación de los  $\alpha$ -hélice del tipo  $3_{10}$  (94).



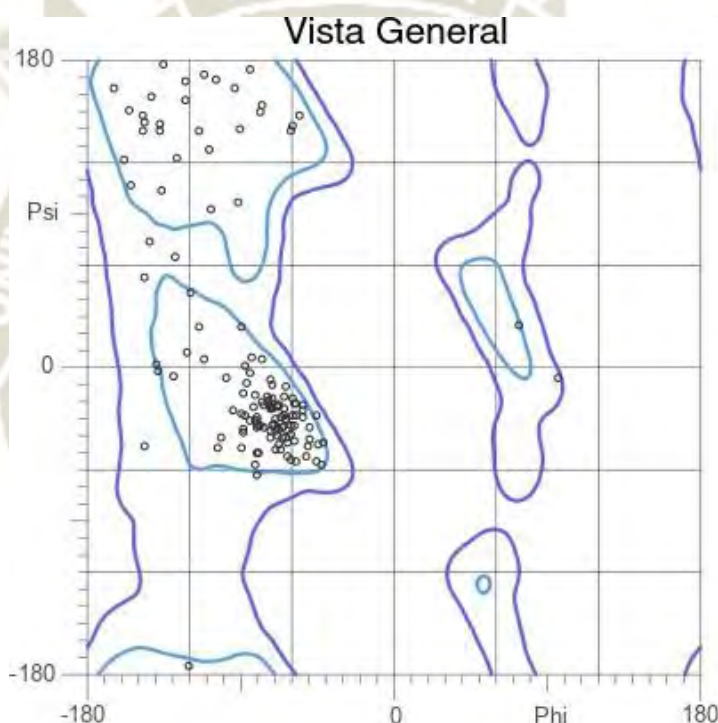
**Figura 3.7:** Representación de la unión del calcio con residuos que conforman el bucle en la estructura.  
Fuente propia.

La unión del calcio a la polcalcina, como se observa en la Figura 3.7, tiene una gran afinidad por residuos de carga negativa (Asp, Glu y Phe) (98), también por residuos que pertenecen al grupo hidrófobo (Ala y Phe), confiriéndole la estabilidad al ligando metálico. Otros residuos que son usuales en la configuración de proteínas con unión al calcio son del tipo sin carga polar (Asn) y residuos especiales como la Gly, que



contribuye con la coordinación de los residuos que se unen al calcio dentro del bucle (99). La Tabla 3.12 se registran las distancias en armstrong entre el calcio y los residuos.

La estructura final modelada cuenta con la validación correspondiente del diagrama de Ramachandran, como se observa en la Figura 3.8. En esta conformación se encontraron más residuos fuera de lugar, como se observa en la Tabla 3.3 entre el modelamiento y la adición de los calcios no hay una gran diferencia estructural, aunque sí registró, después de la adición de los calcios, mayor cantidad de valores atípicos, porque estos residuos presenta átomos duplicados, lo que generaría los choques estéricos. Sin embargo, la ubicación de estos residuos no afectó el desarrollo de los análisis posteriores, por lo que no se tomaron en cuenta.



**Figura 3.8:** Diagrama de Ramachandran de la estructura de la polcalcina Jun o 2 completamente modelada. Con el 91.1 % residuos en la zona favorecida y el 97.9 % de residuos en la zona permitida. Obtenido del servidor MolProbity.

**Tabla 3.3:** Comparación de los datos obtenidos en las gráficas de Ramachandran para el refinamiento (Ref.) y después de la adición del calcio (Ad. Ca)

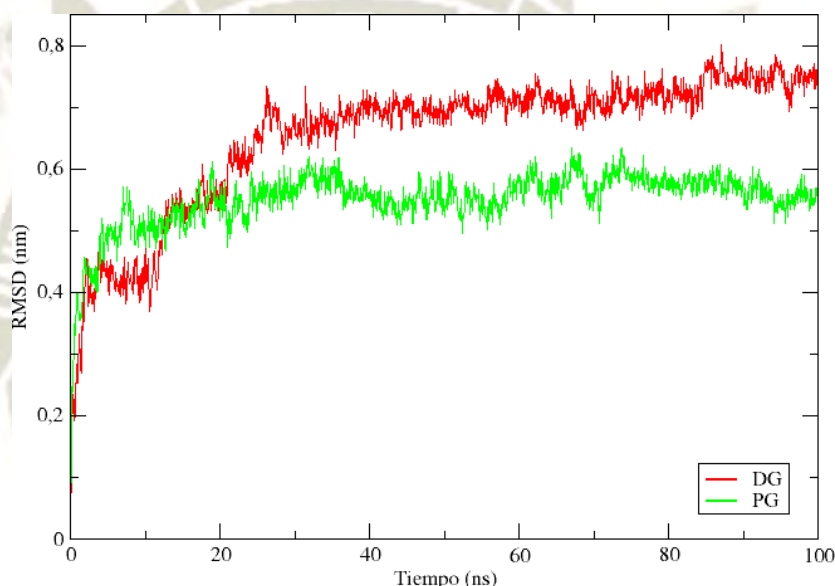
Tipo	Región Fav.	Residuos Fav.	Región Perm.	Residuos Perm.	Valores atípicos
Ref.	95%	96.9% (187/193)	>98%	99.5% (192/193)	Pro19
Ad. Ca	98%	91.1% (173/190)	>99.8%	97.9% (186/190)	Ile4, Val8, Gln23,Ala28



### 3.2. Análisis de los estados de protonación a pH neutro

Existen diferentes formas de realizar las simulaciones en GROMACS, así que, con el propósito de determinar si las condiciones neutras son correctas en GROMACS se realizó las simulaciones a pH 7, la primera en GROMACS sin declarar la protonación (DG) y la segunda declarada en base al servidor PDB2PQR (PG).

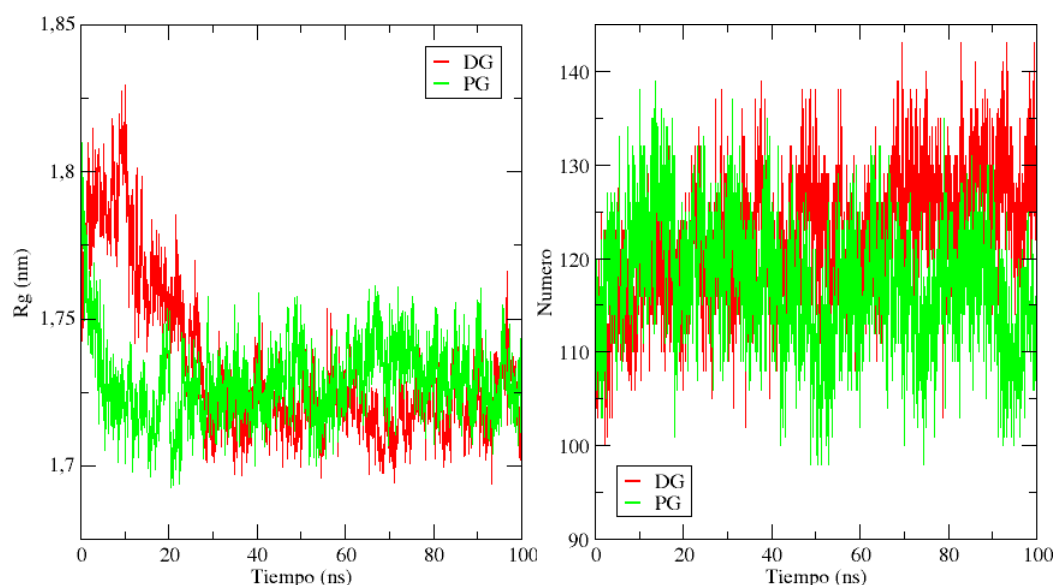
La Figura 3.9 indica que entre el PG y los DG hay una clara diferencia de la proteína por alcanzar su convergencia. En esta última produjo mayor tiempo para llegar al equilibrio (20ns) y permanece entre el delta permitido ( $\delta$  0.2nm) los 0.6 nm mientras que en el PG llega al equilibrio a partir de los 10ns, permaneciendo entre los 0.45 - 0.65 nm (84). Por lo que al declarar los residuos ácidos ha logrado una mayor estabilidad y rápida convergencia.



**Figura 3.9:** La gráfica de RMSD representa las dos condiciones DG y PG en una DM de 100ns.  
Fuente propia.

Comparando las simulaciones a pH neutro (DG y PG) dentro el archivo “. top”, que contiene la topología del sistema, se observó que ambos sistemas generan una carga total de -9. Sin embargo, en la simulación DG el programa GROMACS realizó las protonaciones basadas en sus propios algoritmos, mientras que en la simulación PG las protonaciones se realizan manualmente siguiendo los datos obtenidos por PDB2PQR. Otra diferencia, se encontró dentro de los residuos que se protonaron fue que el residuo de la histidina (His) se protonó de forma diferente en las simulaciones, en DG tuvo una protonación de Hise (protonación del nitrógeno épsilon); en PG fue Hisd (protonación del nitrógeno delta). La literatura ha considerado este residuo como un determinante de selectividad electrostática (100). Por lo que, el tipo de protonación que tuvo, en cada una de las simulaciones, ha

influido en la estabilidad estructural del  $\alpha$ -hélice (97).



**Figura 3.10:** Gráficas de: (a) Radio de giro y (b) Enlaces de hidrógeno a condiciones de DG y PG.  
Fuente propia.

En las gráficas del radio de giro en ambas simulaciones (Figura 3.10(a)) se muestra que la fluctuación en PG alcanza la compactación rápidamente (5ns), con una desviación estándar de 0.01 (Tabla 3.4). Es interesante observar que en este mismo lapso de tiempo la proteína DG sufre un proceso de despegamiento y se estabiliza a partir de los 30ns llegando a una desviación estándar de 0.13 logrando que el margen de error sea más amplio para esta simulación. Sin embargo, entre los 60 - 80ns el plegamiento de PG es mayor, antes de llegar a una similitud desde los 80ns.

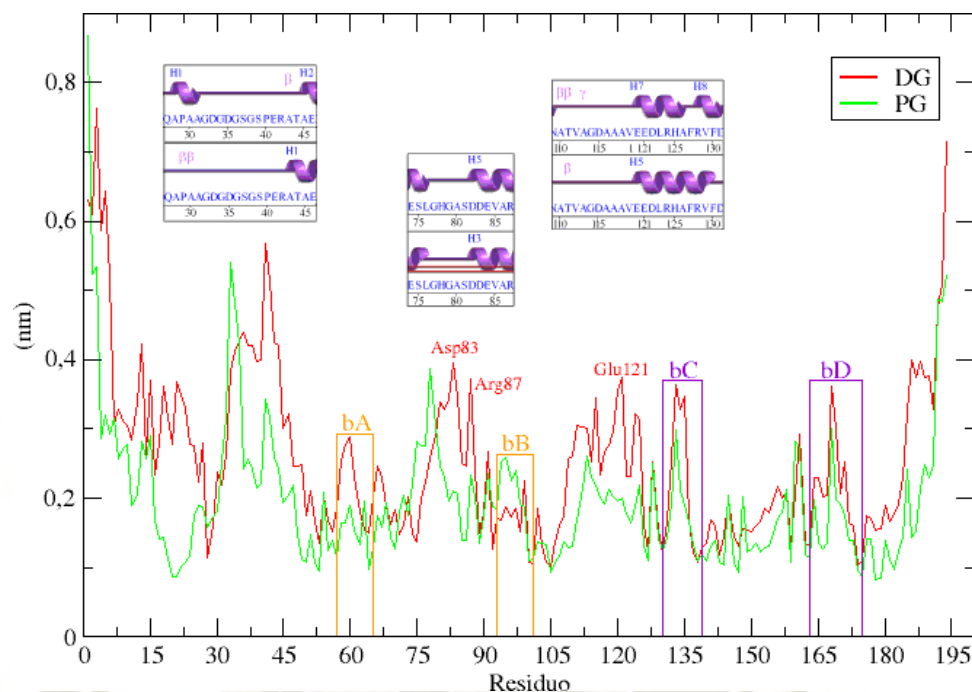
En la Figura 3.10(b) se muestran los enlaces de hidrógeno obtenidos durante la simulación. En ambos casos se alinean al inicio, pero a los  $\sim 45$ ns se separan, siendo a PG se mantiene la cantidad a comparación que DG donde aumentan los enlaces de hidrógeno. Se puede deducir que la generación de estos enlaces en DG es debido a que en la simulación se ha generado gran cantidad de enlaces en su esfuerzo para obtener la estabilidad estructural, como muestra la Figura 3.9 mayor desestabilización y tiempo para llegar al equilibrio.

**Tabla 3.4:** RMSD, RMSF, radio de giro y enlaces de hidrógeno en las simulaciones a DG y PG.

TIPO	RMSD	Radio de Giro	Enlaces de H.
DG	$0.65 \pm 0.11$	$1.73 \pm 0.13$	$122.21 \pm 7.02$
PG	$0.55 \pm 0.05$	$1.73 \pm 0.01$	$117.23 \pm 6.89$

Con base en la referencia conformacional en la base de datos UniProt, se identificó los

4 bucles de posicionamiento del calcio: bA (Asp57 - Ser65) para el primer Ca<sup>2+</sup>, bB (Asp93 - Ser101) en el segundo Ca<sup>2+</sup>; bC (Phe130 - Ser139) en el tercer Ca<sup>2+</sup>; bD (Ile163 - Ser175) en el cuarto Ca<sup>2+</sup> (Figura 3.11).



**Figura 3.11:** RMSF los recuadros señalan la ubicación de los calcio. Cuadros naranjas: Bucles cortos (Asp57 - Ser65 y Asp93 - Ser101), Violetas: Bucles largos (Phe130 - Ser139 e Ile163 - Ser175). Fuente propia.

En este trabajo se consideró a bA y bB como bucles cortos, bC y bD como bucles largos. Donde bA y bB a condición de PG, la estructura se encuentra más estable. Por lo contrario, las fluctuaciones más altas corresponden a las obtenidas en la simulación DG, se observa en los bucles bA, bC y bD que hay mayor vibración. Es posible que en el modelamiento al dejar los bucles bC y bD largos, permita a la molécula de calcio moverse al intentar encontrar un sitio adecuado, siendo la causa de las altas fluctuaciones (>0.2) en la gráfica RMSF (101) (Figura 3.11).

La Figura 3.11 presenta el alineamiento de las fluctuaciones entre estas simulaciones neutras. Entre los residuos Ala30 y Ala45 se registra altas fluctuaciones ya que estas corresponden a los coils. En DG los residuos Asp83, Arg87 y Glu121, revelan más altas fluctuaciones en contraste con las obtenidas específicamente dentro de los bucles pertenecen a las  $\alpha$ -hélices estructurales por ello en esta simulación hay menor estabilidad ya visto anteriormente en la gráfica del RMSD. Además, hay gran diferencia estructural en las zonas de alta fluctuación, donde encontramos mayor cantidad de estructuras, que son las  $\alpha$ -hélices,  $\beta$ -strands y horquillas  $\beta$ , que dan mayor estabilidad a la polcalcina es en PG.

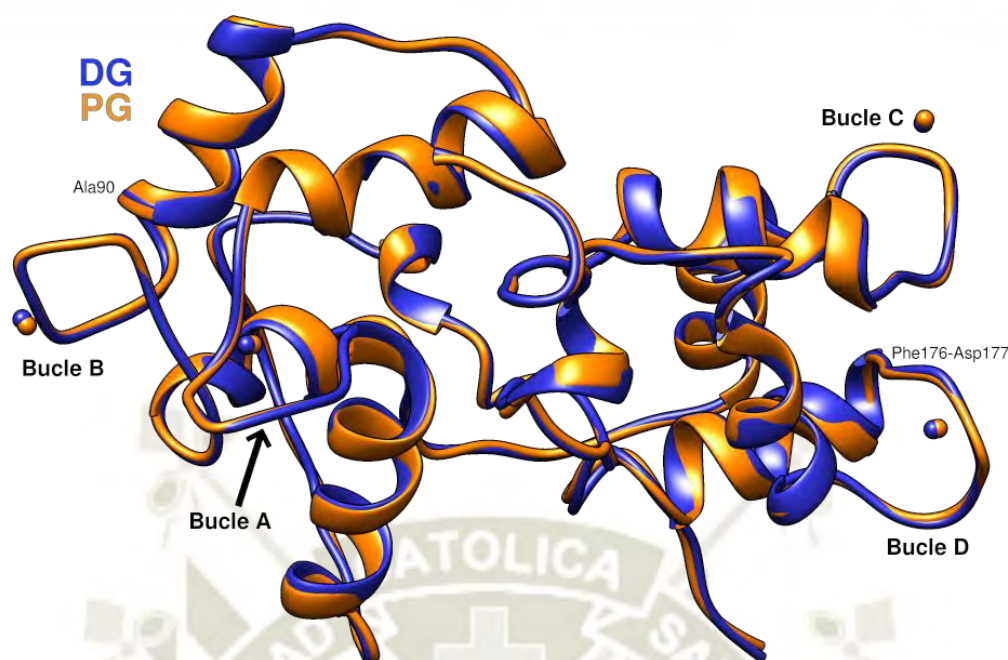


Se ha observado que hay residuos con alta vibración (Tabla A.14), en especial los que se declaran como el Asp y Glu (98). Esta alta fluctuación es debido a su importante función de mantener la unión del calcio en el bucle, ya que están cargados negativamente. La simulación DG muestra que residuos como el Asp y Glu cercanos al ion calcio que no corresponden exclusivamente al bucle colaboran con esta unión, por lo contrario, PG tiene los residuos con carga negativa necesaria, dentro del bucle para mantener la unión al calcio. También, señalar que en la simulación DG ha perdido interacciones con residuos importantes como el Asn169 y Asp171 (99) (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5:** Datos registrados de la distancia del calcio en las simulaciones. Obtenido de PDBSum.

Ubicación del calcio	Tipo de residuo	Distancia	
		DG	DP
<b>Bucle A</b> <b>195</b>	ASP57	2.41	2.52
	ASN59	3.30	3.15
	ASP61	2.41	2.32
	ARG63	3.16	2.93
<b>Bucle B</b> <b>196</b>	ASP95	2.45	2.53
	ASP97	2.74	2.50
<b>Bucle C</b> <b>197</b>	ASP133	3.03	2.48
	SER135	3.00	2.48
<b>Bucle D</b> <b>198</b>	ASP167	2.77	2.76
	ASN169		3.89
	ASP171		2.88
	LEU173	3.07	2.96
	GLU178	2.93	2.29

Empleando la herramienta MatchMaker del programa CHIMERA, se realizó una comparación estructural entre ambas simulaciones (Figura 3.12) obteniendo un RMSD=0.35 Å, la cual indica el grado de semejanza no difiere tanto en la conformación. Como se muestra en el tipo de formación que tiene el residuo Ala90 en la simulación DG corresponde a un coil y en PG, tiene una forma de  $\alpha$ -hélice. Otra diferencia en la configuración, es entre los residuos Phe176-Asp177 que en PG su estructura es un coil, a diferencia de DG donde se ha formado un  $\alpha$ -hélice.



**Figura 3.12:** Comparación mediante la herramienta MatchMaker en CHIMERA. Se visualiza las estructuras a DG en color azul y a PG en naranja. Fuente propia.

La Tabla 3.6 son datos obtenidos a partir del análisis del diagrama de Ramachandran, en él se observa que PG registró menor cantidad de residuos fuera de las zonas permitidas, además de tener valores más altos en la zona permitida (99.5 %) a diferencia de DG (97.9 %).

**Tabla 3.6:** Datos obtenidos de las gráficas Ramachandran

Tipo	Región Fav.	Residuos Fav.	Región Perm.	Residuos Perm.	Valores atípicos
DG	98%	98.1% (171/192)	>99.8%	97.9% (188/192)	Val8, Gln23, Ala28, Pro29
PG	98%	89.6% (172/192)	>99.8%	99.5% (191/192)	Gln23

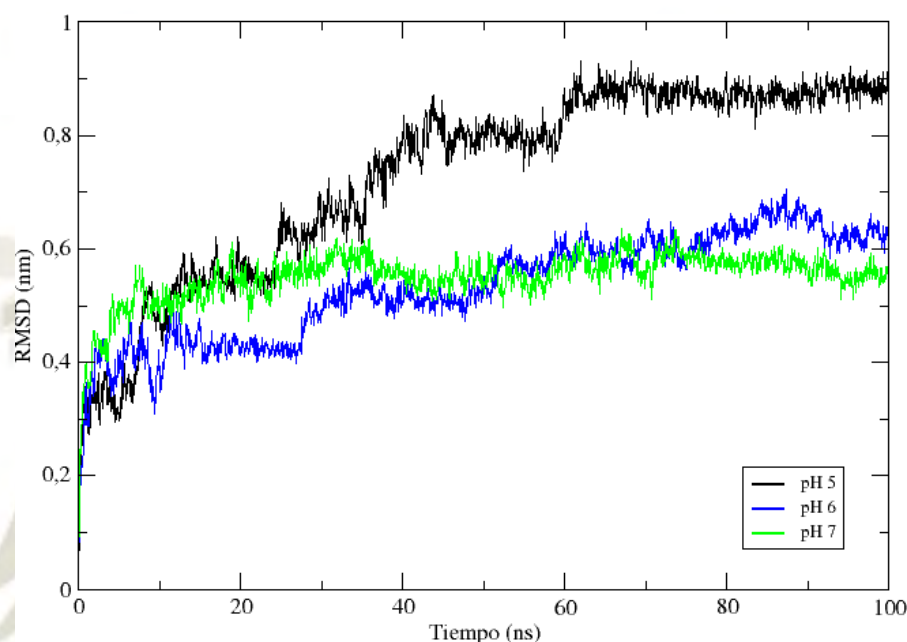
### 3.3. Análisis de la Dinámica Molecular a distintos pH

Para realizar las simulaciones se empleó el servidor PDB2PQR, el que nos proporcionó información sobre las cargas totales y los estados de protonación de los residuos de la polcalcina Jun o 2 a varios pH (5, 6 y 7), como se muestra en las tablas del apéndice B.7. En la siguiente Tabla 3.7 se muestra la variación de la carga para las condiciones de pH, siendo a pH 7 más negativa.

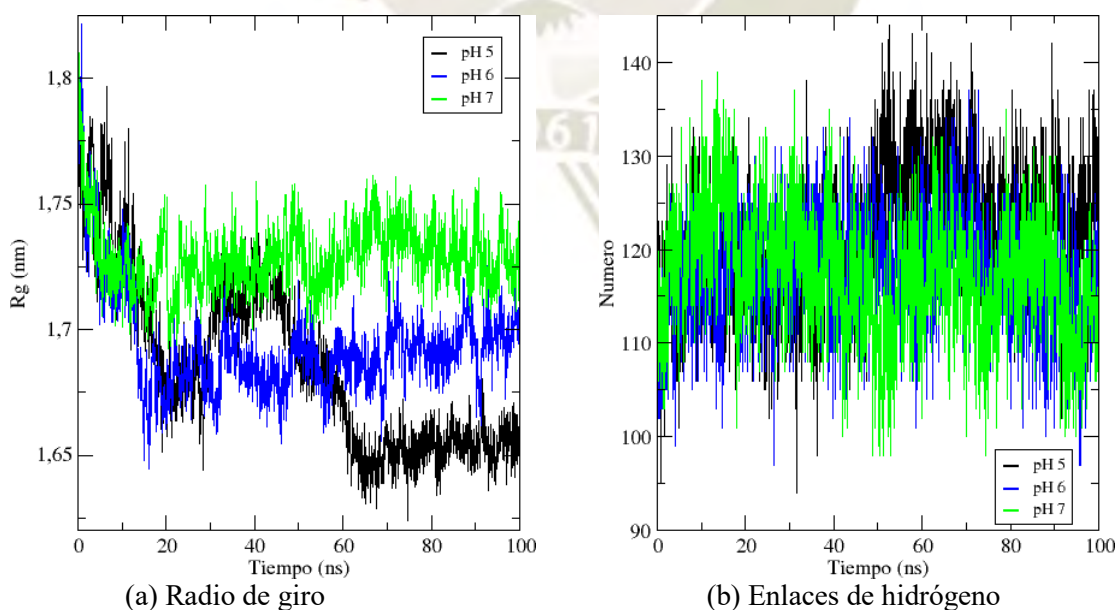
**Tabla 3.7:** Cargas obtenidas al emplear el servidor PDB2PQR en los pH seleccionados.

Tipo	pH5	pH 6	pH 7
Carga total	-5.0	-7.0	-9.0

En el análisis del RMSD se tomó como referencia la convergencia a pH 7. Se discierne por la Figura 3.13 que a pH 5 hay una mayor inestabilidad porque la curva ha ido creciendo progresivamente y llegó a convergir en un rango de 0.8 - 1 nm en un tiempo de 60ns. El pH 6 revela bastante fluctuación y una curva más baja en contraste con el pH 5. En el pH 6 se obtuvo un promedio y desviación cuadrática del RMSD  $0.54 \pm 0.01$ , mayor que el pH 7 ( $0.55 \pm 0.05$ ), tal como se muestra en la Tabla 3.8.



**Figura 3.13:** Análisis del RMSD en los pH 5, 6 y 7 en una DM a 100ns. Fuente propia.



**Figura 3.14:** Análisis de los a pH 5, 6 y 7 de la proteína Jun o 2 en un ensamble NPT a 309.65 K. Fuente propia.

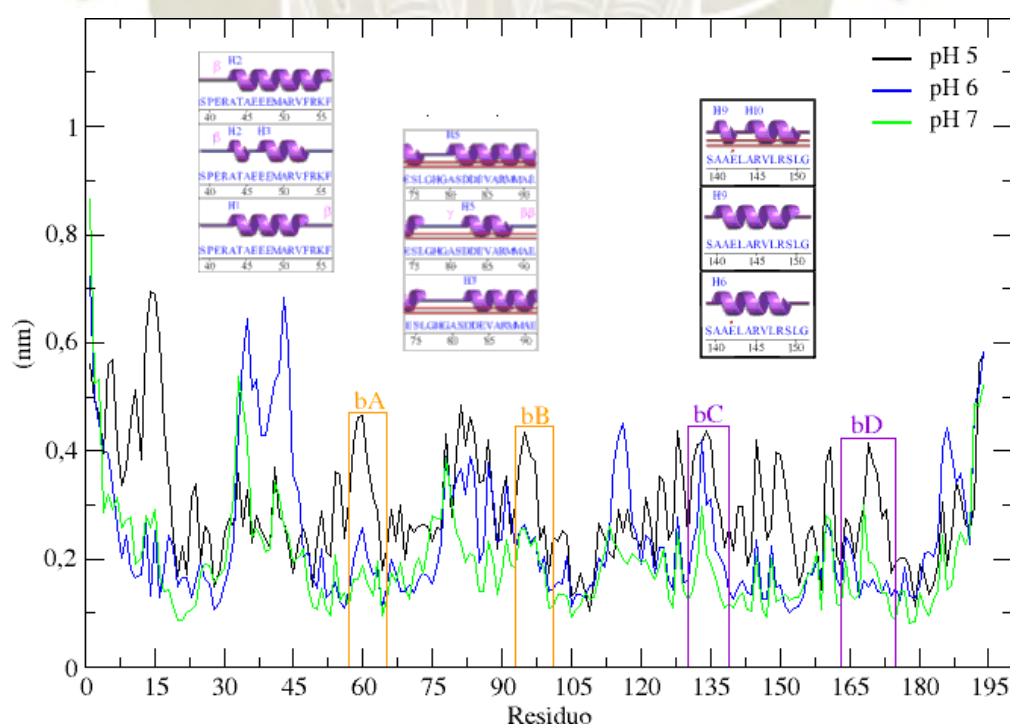


Se visualizó en la película de la DM del pH 5, la formación de un dominio EF- hand más cerrado y de nuevas estructuras secundarias como  $\alpha$ -hélices (Tabla 3.10), lo que explica los altos valores del RMSD, la compactación del radio de giro y la generación de enlaces de hidrógeno. Además se registró que a este pH los valores de la desviación estándar son mayores a diferencia de los otros (pH6 y pH 7) (Tabla 3.8).

**Tabla 3.8:** RMSD, radio de giro y enlaces de hidrógeno en las simulaciones a pH 5, pH 6 y pH 7.

Tipo	RMSD	Radio de giro	Enlaces de H.
pH 5	$0.73 \pm 0.17$	$1.68 \pm 0.03$	$121.67 \pm 7.28$
pH 6	$0.54 \pm 0.10$	$1.70 \pm 0.02$	$117.42 \pm 5.99$
pH 7	$0.55 \pm 0.05$	$1.73 \pm 0.01$	$117.23 \pm 6.89$

En la realización del alineamiento de los distintos pH, empleando la gráfica del RMSF se observó (Figura 3.15) altos picos a pH 5 en las zonas correspondientes a los bucles, a diferencia de los otros, por lo que la unión con el calcio es inestable. El pH 6 muestra semejante fluctuación con el pH 7, al analizar la gráfica, las fluctuaciones del pH 6 es ligeramente más baja que el pH 7 y comparte zonas de alta fluctuación. En la Figura 3.15, también se muestran las otras regiones proteicas con altas fluctuaciones, que evidencian la inestabilidad estructural de las  $\alpha$ -hélices a pH 5, lo que genera su separación.

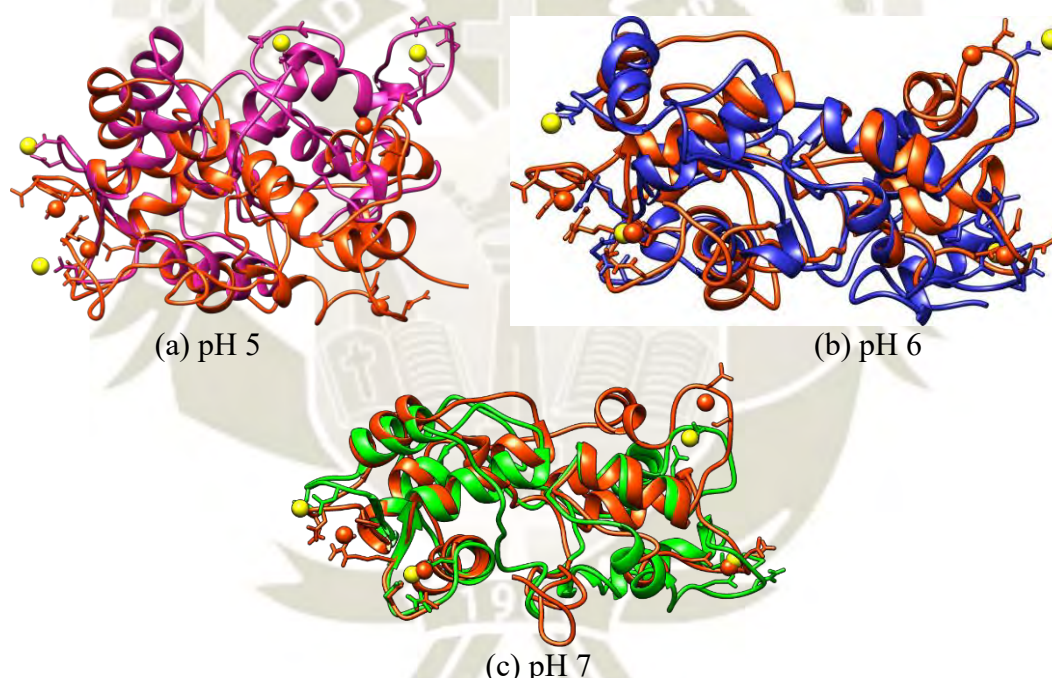


**Figura 3.15:** RMSF los recuadros señalan la ubicación de los calcios. Cuadros naranjas: bucles cortos, cuadros violetas: bucles largos. Fuente propia.

En el programa CHIMERA, se realizó una comparación de la estructura inicial y la obtenida después de la DM (Figura 3.16). Al registrar esta cercanía entre los pH y la estructura inicial podemos decir que se esperaba que el pH 5 tenga un mayor RMSD (1.10 Å) y menor coincidencia (37 pares de átomos) entre todos, sin embargo, es el pH 6 quien obtuvo el mayor valor con 1.40 Å y menor coincidencia con 34 pares de átomos (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9:** RMSD obtenido al comparar la estructura inicial con los distintos pH.

pH	Coincidencia	RMSD
5	en 37 pares de átomos	1.10 Å
6	en 34 pares de átomos	1.40 Å
7	en 65 pares de átomos	1.30 Å



**Figura 3.16:** Gráficas de alineamiento con la herramienta MatchMaker del software CHIMERA a distintas condiciones de pH. La estructura inicial esta coloreada de naranja, mientras que los pH 5, 6 y 7 coloreados de purpura, azul y verde correspondientemente. Fuente propia.

La estructura en condición a pH 5, se observa que la polcalcina ha cambiado, ya que presenta formación de nuevas distribuciones secundarias de hojas- $\beta$ , horquilla  $\beta$  y  $\alpha$ -hélices, como se muestra en la Tabla 3.10. Ésta transformación estructural explicaría la alta inestabilidad que se registró en el RMSD, generación de puentes de hidrógeno y su posterior compactación (Figura 3.14).

**Tabla 3.10:** Comparación de las estructuras a diferentes condiciones de pH realizadas en la DM.

Condición	Inicial	pH 7	pH 6	pH 5
Hoja- $\beta$	1	1	1	2
Horquilla $\beta$	1	1	1	2
Strands	2	2	2	4
$\alpha$ -Hélice	12	9	12	14
Interac. entre hélices	13	9	8	12
Giro $\beta$	23	22	19	18
Giro $\gamma$	1	1	4	1

Inicialmente en los datos obtenidos del análisis de las gráficas de Ramachandran, se observó residuos con valores atípicos, posteriormente al aplicar el pH 5 estos valores desaparecieron (Tabla 3.11), en el caso del pH 7 se mantuvo un solo residuo (Gln23) fuera de la región permitida, en el pH 6 se mantuvieron los residuos Gln23, Ala28 y se cambiaron los residuos Ile4 y Gln23 por Arg15 y Gln25.

**Tabla 3.11:** Datos obtenidos de las gráficas Ramachandran.

Tipo	Región Fav.	Residuos Fav.	Región Perm.	Residuos Perm.	Valores atípicos
Inicial	98%	91.1% (173/190)	>99.8%	97.9% (186/190)	Ile4, Val8, Gln23, Ala28
pH 5	88%	98.0% (169/192)	>99.8%	100% (192/192)	
pH 6	98%	84.4% (188/192)	>99.8%	97.9% (187/192)	Arg15, Gln23, Gln25, Ala28
pH 7	98%	89.6% (172/192)	>99.8%	99.5% (191/192)	Gln23

La unión del calcio en el bucle de la polcalcina, la interacción se debió a los enlaces electrostáticos con residuos como el Asp, Arg, Ser, Phe y Asn que es significativo debido a la fuerza del enlace brindándole mayor estabilidad al calcio dentro del bucle respectivo, como se ve en la siguiente Tabla 3.12. En esta tabla, se observa que el calcio varía su posición en comparación a la estructura inicial, perdiendo interacciones con residuos como Arg63, Phe99, Gly170 y Glu172; pero ganando otros como Leu173 y Glu178, residuos que han colaborado con su permanencia dentro del bucle.

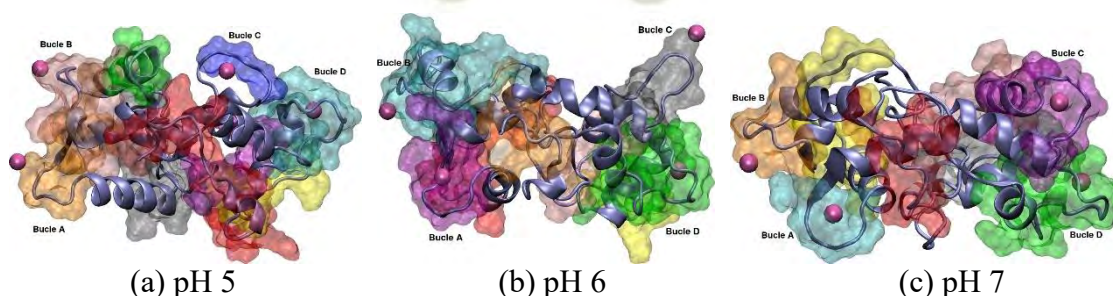


**Tabla 3.12:** Distancia del calcio en las distintas condiciones a las que se ha realizado las simulaciones. Obtenido de PDBSum.

Ubicación del calcio	Tipo de residuo	Distancia			
		Inicial	pH 7	pH 6	pH 5
<b>Bucle A</b> <b>195</b>	ASP57	2.48	2.52	2.43	2.52
	ASN59	3.37	3.15	3.19	2.15
	ASP61	3.54	2.32	2.46	2.32
	ARG63	3.39	2.93	3.01	2.30
<b>Bucle B</b> <b>196</b>	ARG63	3.49			
	ASP95	3.21	2.53	2.42	2.53
	ASP97	3.68	2.50	2.71	2.50
	PHE99	3.36			
<b>Bucle C</b> <b>197</b>	ASP133	3.82	2.48	2.49	2.48
	SER135	3.71	2.48		2.48
<b>Bucle D</b> <b>198</b>	ASP167	3.25	2.76	2.42	2.76
	ASN169	3.24	3.89	2.90	3.89
	GLY170	2.44			
	ASP171	3.15	2.88	3.16	2.54
	GLY172	2.40			
	LEU173		2.96	2.77	2.96
	GLU178		2.29	2.44	2.40

### 3.4. Análisis de los epítopos

Este análisis sirvió para la elección de las soluciones a emplear para las simulaciones del acoplamiento molecular entre la polcalcina *Jun o 2* y la IgE. Se observó que a pH 5 hay un epítipo más a diferencia de los demás (Tabla E.1), solo que esta condición tiene menores valores en los scores para la predicción de la probabilidad para que se una a ese epítipo.



**Figura 3.17:** Representación coloreada en base al score de los epítopos encontrados en la estructura de la polcalcina a los distintos pH estudiados. El código empleado, para el orden de mayor a menor probabilidad, es rojo, naranja, amarillo, cian, gris, verde, rosa, morado y azul. Fuente propia.

### 3.5. Análisis del acoplamiento molecular

#### 3.5.1. Dinámica molecular

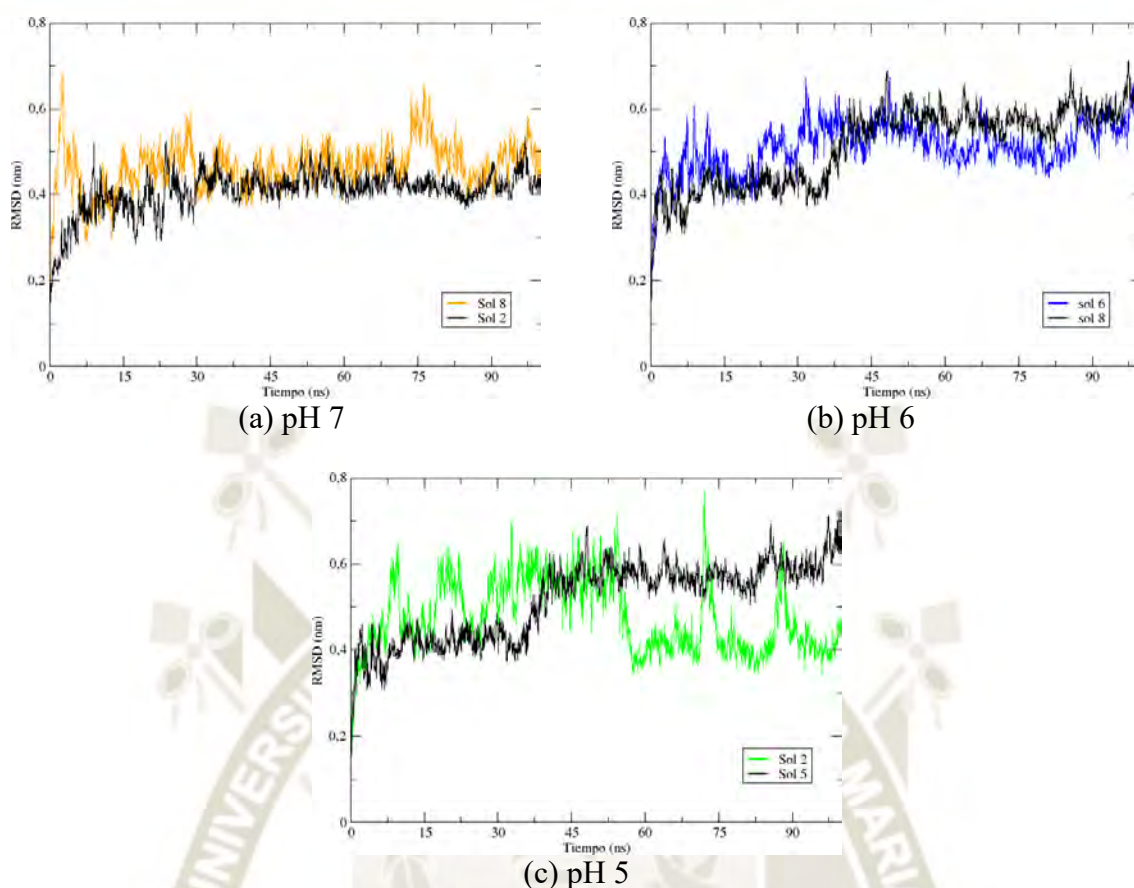
El estudio del acoplamiento molecular en una reacción alérgica es importante para observar el comportamiento del complejo antígeno-anticuerpo a diferente condición de pH (5, 6 y 7). Así que, se seleccionó dos soluciones por cada pH, obtenidas de los servidores especializados en predecir estos acoplamientos, los que han provisto de una mejor comprensión de esta interacción.

**Tabla 3.13:** Datos del promedio y desviación estándar del RMSD, radio de giro y enlaces de hidrógeno en las simulaciones a pH 5, pH 6 y pH 7.

Tipo	Solución	RMSD	Radio de giro	Enlaces de H.
pH 5	2	$0.48 \pm 0.08$	$3.13 \pm 0.06$	$428.89 \pm 10.72$
	5	$0.67 \pm 0.16$	$3.32 \pm 0.04$	$423.92 \pm 11.50$
pH 6	6	$0.51 \pm 0.06$	$3.26 \pm 0.05$	$429.95 \pm 10.55$
	8	$0.52 \pm 0.09$	$2.96 \pm 0.37$	$430.09 \pm 11.60$
pH 7	2	$0.41 \pm 0.05$	$3.01 \pm 0.02$	$435.25 \pm 10.02$
	8	$0.46 \pm 0.06$	$3.07 \pm 0.03$	$432.23 \pm 10.19$

El RMSD de la polcalcina Jun o 2 a diferentes condiciones de pH, muestra que el pH 5 registra mayor inestabilidad para llegar a la convergencia, solo es la solución 5 la que converge a un tiempo de 40ns permaneciendo entre los 0.5-0.7 nm hasta ~98ns, mientras que la solución 2 permanece inestable (Figura 3.18(c)). El pH 6 sufre para llegar a su convergencia, la solución 8 converge de igual manera a la obtenida en el pH 5 con la solución 5, por otro lado, la solución 6 a pesar de no mostrar picos tan sesgados como en la solución 2 del pH 5, aún no converge (Figura 3.18(b)). Finalmente, en el pH 7, la solución 2 tiene una convergencia más rápida a 30ns manteniéndose entre 0.35-0.55 a diferencia de las demás (Figura 3.18(a)).

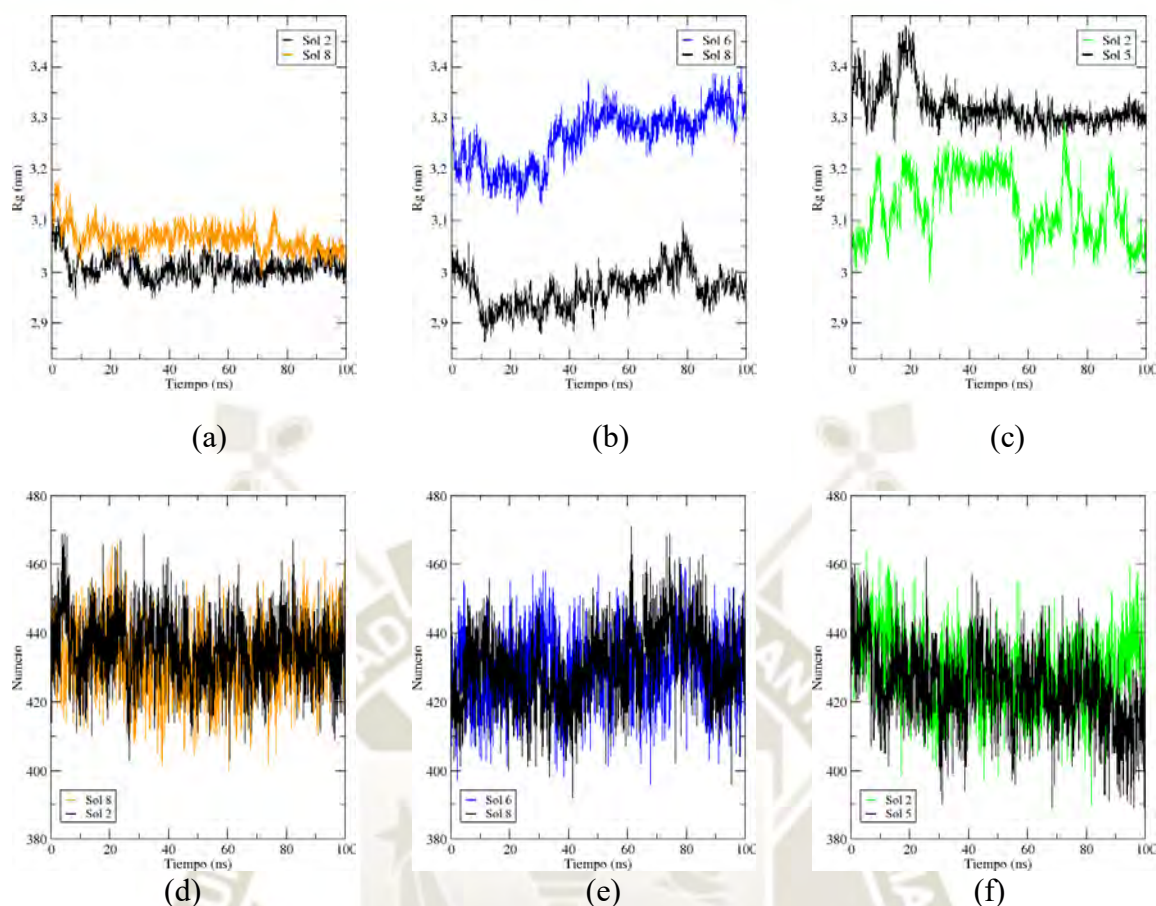




**Figura 3.18:** Análisis RMSD de las soluciones del acoplamiento a los pH 7, 6 y 5 de la proteína Jun o 2 en un ensamble NPT a 309.65 K. Fuente propia.

Al analizar el plegamiento o compactación de la estructura y la generación de enlaces de puente de hidrógeno (Tabla 3.19), se pudo descubrir el comportamiento del acoplamiento en el complejo. Por lo que al observar la figura anterior, llama la atención las gráficas obtenidas en las soluciones del radio de giro de los pH 5 y 6. En la primera se constata un desplegamiento estructural uniforme para la solución 5, a diferencia de la solución 2 que se mantiene con picos abruptos entre la compactación y descompactación, se infiere que esta inestabilidad estructural ha generado la formación de enlaces de hidrógeno, de forma contraria a la solución 5 donde hay disminución (Fig.3.19(f)). En el pH 6 los picos no son abruptos, pero la Figura 3.19(b) revela un desplegamiento en la solución 6, reacción opuesta a la obtenida en la solución 8, aunque no hay gran diferencia del promedio de los enlaces de hidrógeno pues están entre 429.95 y 430.09 (Tabla 3.13) respectivamente. En el caso del pH 7, las soluciones 2 y 8 se compactan, la primera más que la otra y la Tabla 3.13, en comparación con los otros pH tiene una mayor cantidad de enlaces de hidrógeno.

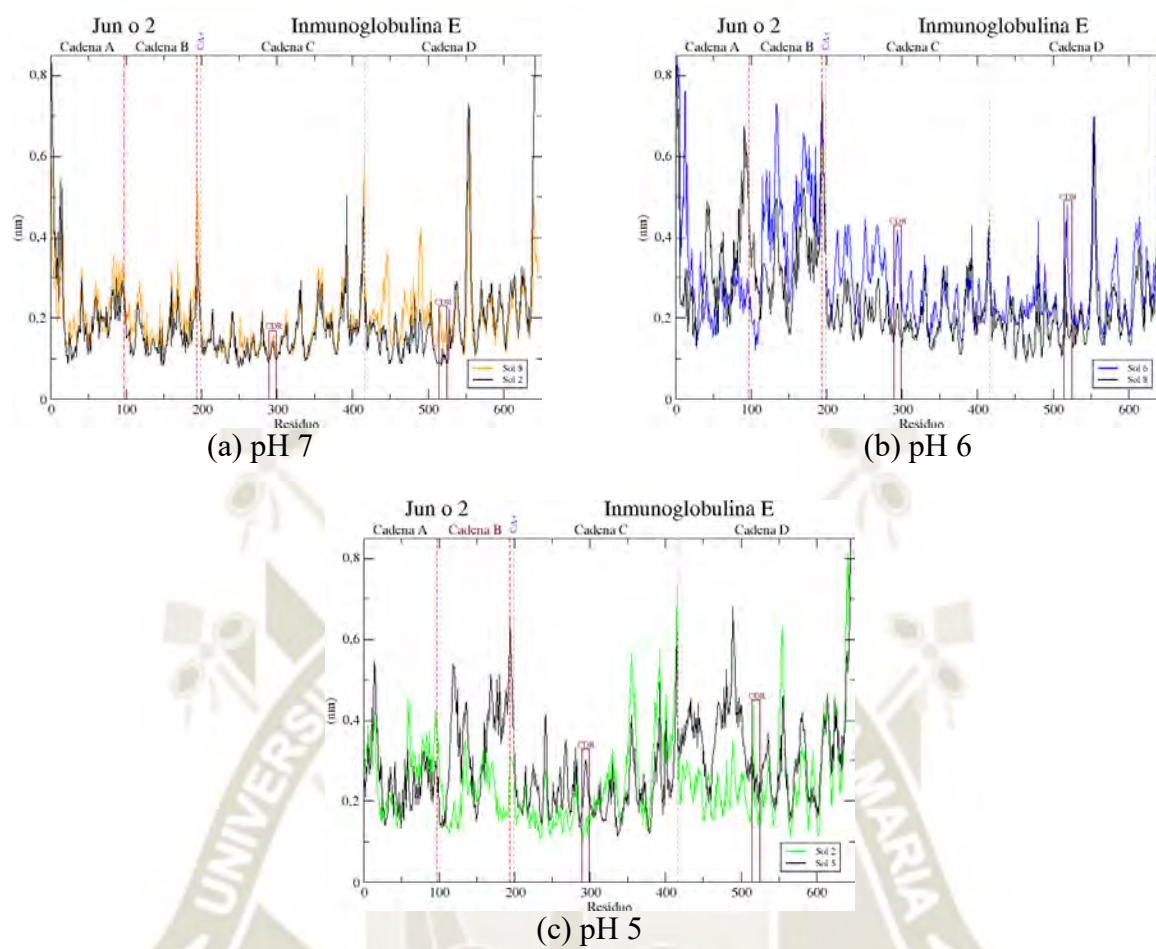




**Figura 3.19:** Análisis del radio de giro (superior) y los enlaces de hidrógeno (inferior) de las soluciones del acoplamiento a los pH 7 (naranja), 6 (azul) y 5 (verde) de la proteína Jun o 2 en un ensamble NPT a 309.65 K. Fuente propia.

Para el RMSF, se tiene en cuenta como ha sido la fluctuación de los residuos del CDR con el fin de determinar si se mantiene la interacción del complejo en un periodo de 100ns. Las soluciones correspondientes al pH 7 tienen bajas fluctuaciones ( $\leq 2$ ) con respecto a la zona del CDR, por lo que el acoplamiento se mantiene estable (Figura 3.20(a)). En base a la información anterior, el pH 6 y pH 5 presentan mayores fluctuaciones ( $\geq 2$ ) en el CDR, como se muestra en la solución 6 (Figura 3.20(b)) y las dos soluciones del pH 5 (Figura 3.20(c)).

Por otro lado, al analizar las vibraciones de toda la estructura del complejo, es el pH 7 quien tiene menores picos en la mayor parte de su estructura, a diferencia de las otras. Se visualiza que en el pH 6 (Figura 3.20(b)) hay una gran fluctuación con respecto a la estructura de la polcalcina, mientras que en el pH 5 (Figura 3.20(c)) es en todo el complejo.



**Figura 3.20:** Análisis RMSF de las soluciones del acoplamiento a los pH 7, 6 y 5 de la proteína Jun o 2 en un ensamble NPT a 309.65 K. En el RMSF los recuadros morados señalan la ubicación de los CDR. Fuente propia.

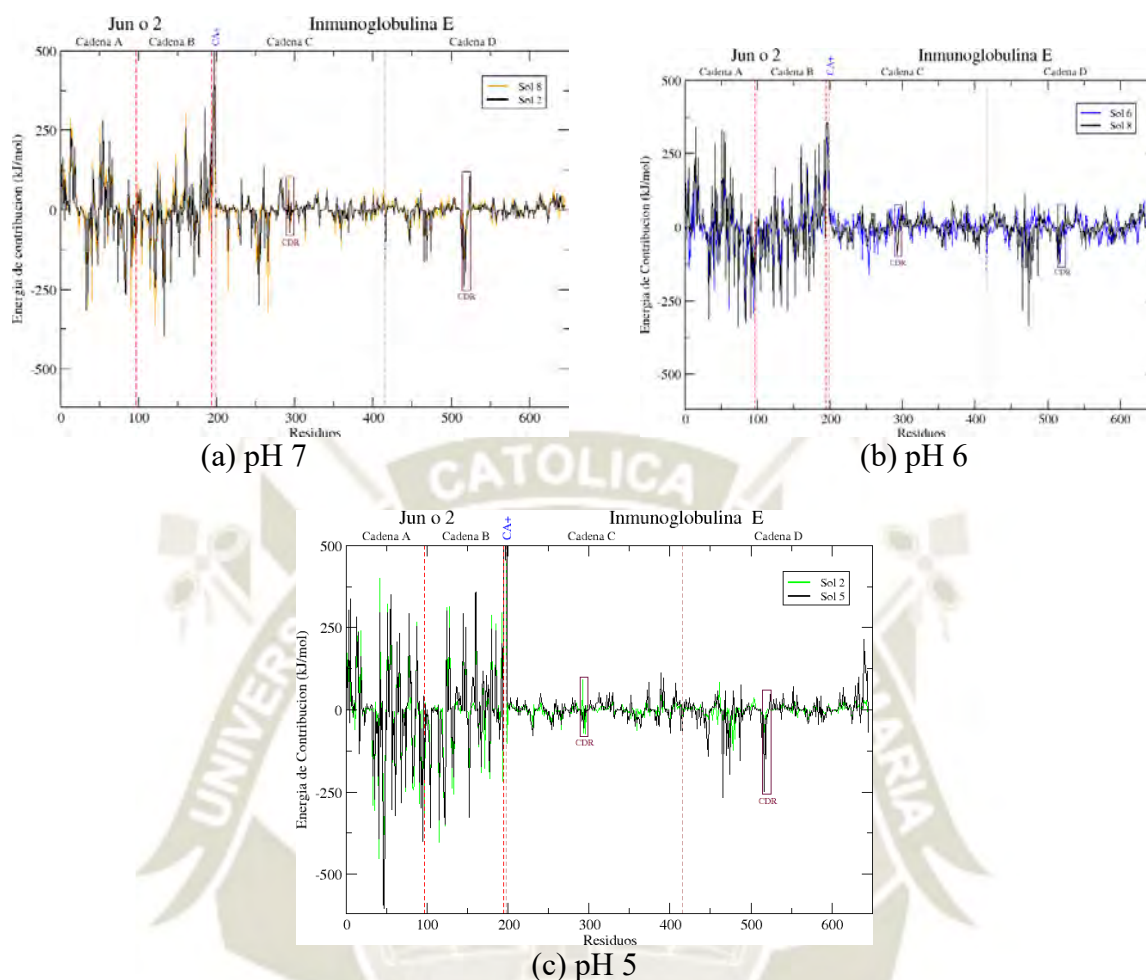
La evaluación de la película de las simulaciones de las soluciones, mostraron que a pH 7 el complejo se mantiene unido, a diferencia del pH 5 que revela solo la interacción con la cadena D de la IgE en la solución 5, que será corroborado con el siguiente análisis de las energías de interacción (Figura A.20).

### 3.5.2. Análisis de la energía de interacción

En la Tabla 3.14 se registró que el pH 7 tiene mayor energía de interacción en las dos soluciones, que se observa va disminuyendo a medida que se reduce el pH. Un análisis más exhaustivo, muestra que los residuos en su mayoría de carga negativa (Asp, Glu) y casos especiales (Tyr y Phe), han contribuido con la interacción entre la polcalcina y la IgE. La figura 3.21(a) muestra mayores picos de interacción en el CDR (mínima  $\geq -100$ ) siendo la de mayor cantidad a -395.17 (Tabla F.11); la figura 3.21(b), registra que la interacción de los picos del CDR han disminuido ligeramente (mínima  $\geq -97$ ), con una cantidad mayor de -336.91 para la interacción (Tabla F.21) y en la figura 3.21(c) la



energía de interacción en la IgE es la mínima  $\geq -50$  y la mayor a  $-604.50$  (Tabla F.30).



**Figura 3.21:** Mapa de la contribución de energía en los residuos. Señalamos en recuadros morados la ubicación del CDR. Fuente propia

En la Tabla 3.14 se muestra la cantidad de energía de interacción que obtuvo el complejo luego de la DM. En concordancia con los análisis realizados anteriormente (RMSD, radio de giro, enlaces de hidrógeno y RMSF), se ha visto que la inestabilidad de la simulación de las soluciones ha influido en la generación de interacciones de baja intensidad como observamos en las soluciones 8 pH 7 y 2 pH 5 que registran altas energías de interacción. Otro punto importante es que, la sol 2 pH 7 y sol 5 pH 5 son representativas, ya que revelan en que pH hay una mayor interacción antígeno - anticuerpo.



**Tabla 3.14:** Resumen del cálculo energético para las energías. Que son: de van der Waal (VDW), electrostáticas (E), polar de solvatación (PS), SASA, SAV y la energía de interacción total (Total).<sup>a</sup> Se reporta la energía SASA, aunque para el cálculo total no se toma la cantidad de Energía SASA. Datos obtenidos de MM-PBSA.

Energía (kJ/mol)	pH 7		pH 6		pH 5	
	Sol 2	Sol 8	Sol 6	Sol 8	Sol 2	Sol 5
VDW	-398.23±13.38	-398.77±3.79	-137.97±17.70	-259.57±13.10	-214.10±31.75	-207.71±3.33
E	-2127.93±75.70	-1689.97±23.50	-841.47±232.30	-800.43±106.46	-1380.48±326.08	114.05±31.87
PS	1101.43±38.84	498.71±18.76	497.94±85.06	587.25±25.90	703.91±103.39	628.68±18.28
SASA <sup>a</sup>	-56.10±1.76	-45.87±0.74	-21.66±2.87	-33.45±1.61	-28.17±4.78	-35.17±0.68
SAV	-433.49±26.93	-404.73± 29.16	-164.49±50.94	-298.67±28.43	-231.32±60.00	-295.84±29.90
Total	-1858.83±70.03	-1996.63±41.19	-648.15±211.03	-771.28±110.22	-1118.08± 286.39	169.13±37.49

La evaluación de las energías interactuantes y no interactuantes, también fueron representadas mediante la Figuras F.5, F.8, F.11. Se visualiza a pH 7 que las soluciones, muestran una separación entre los residuos que colaboran con la energía de interacción y los que no, además como se está dando la interacción entre los residuos del CDR y los de la polcalcina; donde es la sol 8 la que presenta enlaces de hidrógeno a diferencia de la sol 2 que en su caso son todos hidrofóbicos. Las figuras F.6 y F.7 dan a conocer más interacciones entre la polcalcina y la IgE, se ha señalado aquellos que pertenecen a los epítopos y representan por medio de líneas la fuerza de la interacción. Mayormente en este pH han interactuado epítopos y residuos del CDR.

Para el pH 6, las dos soluciones han presentado un enlace de hidrógeno, en la sección A de las figuras se muestran que los residuos que no colaboran con la interacción estuvieron ubicados cerca de la zona en donde interacciona el complejo (Arg124) de la solución 8 (Figura F.8). Las figuras F.9 y F.10 muestran menor cantidad de enlaces con el CDR, en el caso de la solución 6 ha perdido interacciones en la cadena C, siendo la cadena D la que mantiene el acoplamiento.

En el pH 5, las Figura F.11 muestra como hay residuos que rechazan la unión de la polcalcina y la IgE (Arg42 e His125 Figura F.11(a)). En el caso de la solución 5 se ha perdido el enlace con la cadena C, la interacción de dos residuos de la IgE y tres de la *Jun* o 2 mantiene unido al complejo. También, en el análisis de PDBSum se puede ver otros residuos no pertenecientes al CDR se enlazan con epítopos y esto ocurre también para la solución 2.

### 3.5.3. Evaluación de la distancia del calcio

El calcio le confiere a la polcalcina Jun o 2 la estabilidad estructural, además algunos autores creen que es la responsable del reconocimiento de la IgE. La Tabla 3.15 muestra que a pH 7 ha habido un acercamiento de los calcio, tomando en cuenta los datos obtenidos de la Tabla 3.12, su distancia no supera los 3.17nm y la unión al residuo

Ser135 ha cambiado por Glu142, dándole mayor fuerza a esta interacción al ser un residuo negativo. La solución 8 al ser inestable ha perdido residuos de interacción como Asn y Glu. El pH 6 ha perdido un residuo (Ser135) en la solución inestable 8 y la distancia con el calcio ha crecido. A pH 5, las dos soluciones han aumentado ligeramente su distancia, la solución 2 ha perdido residuos (Asp57, Asn59 y Arg63), así como la solución 5 (Asn59 y Arg63) y han obtenido Asp131.

**Tabla 3.15:** Distancia del calcio en las soluciones de acoplamiento para cada una de las condiciones de pH. Obtenido de PDBSum.

Ubicación del calcio	Tipo de residuo	Distancia					
		pH 7		pH 6		pH 5	
		Sol 2	Sol 8	Sol 6	Sol 8	Sol 2	Sol 5
<b>Bucle A 195</b>	ASP57	2.42	2.42	2.60	2.42		2.97
	ASN59	2.95		3.07	3.05		
	ASP61	2.50	2.46	2.39	2.50	2.45	2.89
	ARG63	2.94	2.94	3.03	3.03		
	GLU68	2.81					2.43
<b>Bucle B 196</b>	ASP95	2.46	2.48	2.42	2.47	2.48	2.47
	ASP97	2.50	2.55	2.78	2.49	2.39	2.45
<b>Bucle C 197</b>	ASP131					2.47	2.45
	ASP133	2.84	2.49	2.50	2.39	2.52	2.83
	SER135			3.21		2.49	3.04
	GLU142	2.46	2.41				
<b>Bucle D 198</b>	ASP167	2.78	2.82	2.93	2.40	2.80	2.48
	ASN169	2.95		2.79	3.14	3.15	3.00
	ASP171	3.17	2.79	3.11	3.04	3.16	3.46
	GLY172	2.97	2.99	2.78	3.03	3.16	2.96
	LEU173	2.97	2.99	2.78	3.03	3.16	2.96
	GLU178	2.47	2.62	2.45	2.50	2.55	2.44

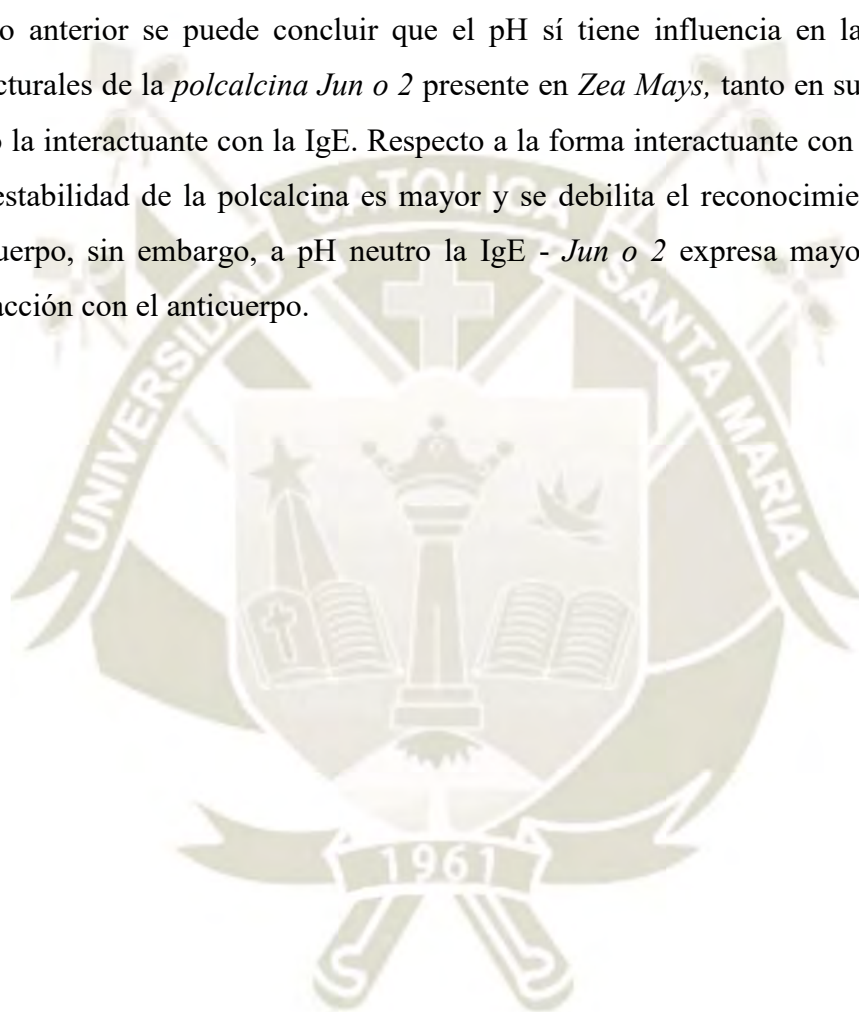
# CONCLUSIONES

1. El modelamiento de la estructura del alérgeno *Jun o 2* se construyó por la técnica *Threading*, a partir de su secuencia aminoacídica haciendo uso del servidor I-TASSER y adicionando posteriormente el calcio. Este modelo muestra una distribución y predicción de estructuras secundarias como  $\alpha$ -hélices (H),  $\beta$ -strands (S) y coils (C), demostrado relativa estabilidad estructural y cumple con las funciones propias de la estructura, siendo validada mediante el diagrama de Ramachandran.
2. Al realizar la DM a pH neutro existieron diferencias en las convergencias de las simulaciones con declaración (PG: 10ns) y sin declaración de los estados de protonación (DG: 20ns), observándose que en la simulación PG se registró una rápida convergencia y estabilidad estructural. Por lo que es importante tener en cuenta los estados de protonación a este pH.
3. Al hacer la evaluación estructural a los distintos pH, se observó que a pH 5 la polcalcina adopta una forma más cerrada o globular, lo que debilitaría el reconocimiento antígeno-anticuerpo, como se ha observado experimentalmente por Tinghino et al. (1998).
4. Se analizó la interacción de la IgE - *Jun o 2* mediante técnicas computacionales. Primero obteniendo las soluciones predichas del acoplamiento en los servidores Patchdock-Firedock. Luego por DM se analizó el comportamiento de este complejo antígeno-anticuerpo y por último se midió la energía de interacción del complejo mediante la metodología de MM-PBSA. La mayor actividad de interacción con el anticuerpo fue a pH 7, ya que registró mayor energía de interacción y número de residuos interactuantes no solo entre los epítopos de la polcalcina y el CDR, sino también entre otros residuos (Tyr, Phe, Asp y Arg), que favorecen la interacción. La menor actividad se registró a pH 5, ya que la polcalcina al adoptar una forma más cerrada a este pH no permite una buena interacción con la IgE.
5. Se determinó la influencia de la unión al calcio y la variación de éste debido a los



distintos pH. En la evaluación de la unión al calcio de la polcalcina aislada, no hay gran variación entre un pH neutro y otro ácido. Sin embargo, en la simulación de la polcalcina interactuante con la IgE, se observó que a pH 5 se perdieron interacciones o hubo un mayor distanciamiento entre el calcio y residuos importantes (Asp y Glu). Lo que sugiere, que la pérdida del calcio sería debido a que la polcalcina adopta su forma cerrada, desplazando al calcio de su lugar.

6. Por lo anterior se puede concluir que el pH sí tiene influencia en las propiedades estructurales de la *polcalcina Jun o 2* presente en *Zea Mays*, tanto en su forma aislada como la interactuante con la IgE. Respecto a la forma interactuante con la IgE, a pH 5 la inestabilidad de la polcalcina es mayor y se debilita el reconocimiento antígeno - anticuerpo, sin embargo, a pH neutro la IgE - *Jun o 2* expresa mayor actividad de interacción con el anticuerpo.



# RECOMENDACIONES

Basados en los resultados, esta investigación puede ser de utilidad para optimizar el empleo de marcadores alergénicos recombinantes en los estudios *in vivo* y de esta forma, se podría mejorar la estandarización de los extractos de alérgenos (102). Aplicar técnicas como *Immunoblotting* permitiría detectar el anticuerpo específico para determinado alérgeno mediante el empleo de distintos buffers y membranas (103).

Se recomienda realizar más estudios sobre los distintos tipos de protonación de la histidina, para evaluar el comportamiento de ésta dentro de la estructura y como puede influir en la estabilidad estructural.

Para poder comprender mejor la influencia del calcio en la polcalcina, se debería analizar su efecto de forma teórica - experimental, así obtener mejores datos para contrastar.

Al finalizar la simulación se observó que la estructura se salía de la caja de simulación, por ello se recomienda arreglar las trayectorias antes de cualquier cálculo para evitar problemas de periodicidad. Algunos tutoriales recomiendan obtener estructuras promedio (.pdb) de toda la dinámica, sin embargo, esta genera duplicidad de información para los residuos, lo que produce estructuras que no corresponden a mínimos energéticos pudiendo obtener resultados erróneos en otros análisis como el Docking molecular. La recomendación es utilizar, ya sea la estructura producida al tiempo final de la simulación o una estructura de mínima energía. Se recomienda que, al realizar la estimación de las energías libres de interacción, emplear periodos de la trayectoria que estén dentro de la convergencia en la estabilidad estructural, esto disminuiría los costos tiempo-maquina.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Pawankar R, Holgate ST, Canonica W, Lockey RF, Blaiss MS, editors. WAO White Book on Allergy: WAO; 2011.
2. Penny E, Murad S, Madrid SS, Herrera TS, Pineiro A, Caceres D, et al. Respiratory symptoms, asthma, exercise test spirometry, and atopy in schoolchildren from a Lima shanty town. *Thorax*. 2001; 56(8): p. 607-612.
3. Robinson CL, Baumann LM, Gilman RH, Romero K, Combe M, Cabrera L. The Peru Urban versus Rural Asthma (PURA) Study: methods and baseline quality control data from a cross-sectional investigation into the prevalence, severity, genetics, immunology and environmental factors affecting asthma in adolescence in Peru. *BMJ open*. 2012; 2(1).
4. Jimenez-Lopez JC, Kotchoni SO, Gachomo EW, Castro-López AJ, Rodríguez-García MI, Alché JD. Molecular features of maize allergens and their implications in human health. In *Maize: Cultivation, Uses and Health Benefits*.: Nova Science Publishers; 2012. p. 137-178.
5. Oldenburg , Petersen A, Baur X. Maize pollen is an important allergen in occupationally exposed workers. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 2011; 6(1): p. 32.
6. Tinghino , Barletta B, Palumbo S, Afferni , Iacovacci P, Mari A, et al. Molecular characterization of a cross-reactive *Juniperus oxycedrus* pollen allergen, Jun o 2: A novel calcium-binding allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998 Jul; 101(06): p. 772--777.
7. Buckler ES, Stevens NM. Maize Origins, Domestication, and Selection. In Motley TJ, Zerega N, Cross H. *Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution, and conservation of crops*.: Columbia University Press; 2006. p. 67-90.
8. Paliwal RL, Granados G, Lafitte R, Violic AD, Marathée JP. *El Maíz en Los Trópicos: Mejoramiento y Producción*: FAO; 2001.
9. Sánchez. Maíz I (*Zea mays*). *Reduca*. 2014; 7(2).
10. OECD. Consensus Document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). *Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology*. 2003; 11(27).
11. Salvador-Reyes R, Pedrosa Silva MT. Peruvian Andean maize: General characteristics, nutritional properties, bioactive compounds, and culinary use. *Food Research International*. 2020; 130: p. 108934.
12. Grobman A, Bonavia D, Dillehay TD, Piperno DR, Iriarte J, Holst I. Pre-ceramic maize from Paredones and Huaca Prieta, Peru. *PNAS*. 2012 January; 109(5): p. 1755–1759.
13. Leiva González S, Gayoso Bazán G, Chávez L. *Zea mays* L. "purple corn" (Poaceae), a cereal used for feeding in Ancient Peru. *ArnaldoA*. 2016; 23(1): p. 295-316.
14. MINAGRI. PLAN NACIONAL DE CULTIVOS. 2019 2020th ed. Peru: MINAGRI; 2019.
15. SIEA. Encuesta Nacional de Intenciones de Siembra 2019. 2019 Julio..
16. Alfaya T, Baltasar MA, Belmonte J, Benjumeda A, Cardona V, Chaparro A, et al. *Polinosis: Polen y Alergia*: mra ediciones, S.L.; 2002.
17. El-Ghazaly G. Tapetum and orbicules (Ubisch bodies): development, morphology and role of pollen grains and tapetal orbicules in allergenicity. In Cresti M. CG,MA, editor. *Fertilization in Higher Plants*.: SpringerBerlin, Heidelberg; 1999. p. 157-173.
18. Pacini E, Hesse M. Pollenkitt-its composition, forms and functions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 2005; 200(5): p. 399-415.
19. Cabrera Sierra M. Cuantificación de alérgenos de "poaceae, oleaceae, platanaceae y cupressaceae" en la atmósfera de Madrid y su correlación con los recuentos de pólenes y las variables meteorológicas y de contaminación (2009-2010: Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones; 2011.
20. Dimitrov , Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by



- descriptor fingerprints. *Bioinformatics*. 2013 October; 30(6): p. 846-851.
21. Valdez GR, Pereira Q, Zini A, Canteros G. Reacciones de hipersensibilidad. *Revista de Posgrado de la VIª Cátedra de Medicina*. 2007; 167: p. 11-16.
  22. Cennelier M. La alergia y la homeopatía/Allergy and Homeopathy. 1999.
  23. Johansson SGO, Hourihane JB, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001; 56(9): p. 813--824.
  24. José M, Galván T, Carlos J, Pérez R. Genes y factores ambientales en el desarrollo de asma y atopía. *Medicina Clínica*. 2000; 114(18): p. 698--703.
  25. Ballesta F. Genética y alergia. *Allergologia et Immunopathologia*. 1998; 26(3): p. 81-119.
  26. Singh B, Mathur C. An aerobiological perspective in allergy and asthma. *Asia Pacific Allergy*. 2012; 2(3): p. 210.
  27. Eiringhaus K, Renz H, Matricardi P, Skevaki C. Component-Resolved Diagnosis in Allergic Rhinitis and Asthma. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*. 2019 October; 3(5): p. 883-898.
  28. Sastre J, Landivar ME, Ruiz-García M, Andregnette-Rosigno MV, Mahillo I. How molecular diagnosis can change allergen-specific immunotherapy prescription in a complex pollen area. *Allergy*. 2012; 67(5): p. 709-711.
  29. Chapman D, Smith A, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomés A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2000; 106(3): p. 409-418.
  30. Carretero Anibarro PJ. Aplicación y utilidad del diagnóstico basado en componentes moleculares en pacientes alérgicos al polen de cupresáceas: Universidad de Valladolid; 2018.
  31. Arruda LK, Barbosa CR, Bardini G, Yang C, Genov IR, Moreno AS. Alérgenos recombinantes: papel no diagnóstico e na imunoterapia alérgeno-específica. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*. 2013; 1(4): p. 211--218.
  32. Garrote A, Bonet R. Alergias y antialérgicos: causas, tipos y tratamientos. *Offarm: farmacia y sociedad*. 2004; 23(3).
  33. Pomés A. Relevant B Cell Epitopes in Allergic Disease. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2010; 152(1): p. 1-11.
  34. Weber RW. Cross-reactivity of pollen allergens: impact on allergen immunotherapy. *Annals of allergy, asthma & immunology*. 2007 November; 99(3): p. 03--11.
  35. Tinghino , Twardosz A, Barletta B, M.R. Puggioni E, Iacovacci P, Butteroni C, et al. Molecular, structural, and immunologic relationships between different families of recombinant calcium-binding pollen allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002 February; 109(2): p. 314--20.
  36. Popescu FD, Vieru M. Polcalcins as pollen panallergens in allergic rhinitis. *Romanian Journal of Rhinology*. 2016 March; 6(21): p. 19-22.
  37. Wopfner N, Dissertori O, Ferreira F, Lackner P. Calcium-binding proteins and their role in allergic diseases. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2007; 27(1): p. 29--44.
  38. Niederberger V, Hayek B, Vrtala S, Laffer S, Twardosz A, Vangelista L, et al. Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo-and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7. *The FASEB journal*. 1999; 13(8): p. 843--856.
  39. Kawasaki , Kretsinger RH. Structural and functional diversity of EF-hand proteins: evolutionary perspectives. *Protein Science*. 2017; 26(10): p. 1898--1920.
  40. T. Henzl M, G. Sirianni A, Wycoff W, Tan A, J. Tanner J. Solution structures of polcalcine Phl p 7 in three ligation states: Apo-, hemi-Mg 2+ -bound, and fully Ca 2+ -bound. *Proteins*. 2013 February; 81(2): p. 300--315.
  41. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic

- patient. Allergy, Asthma & Clinical Immunology. 2010 January 18; 6(1): p. 1.
42. Mas S, Garrido-Arandia M, Batanero E, Purohit A, Pauli G, Rodriguez R, et al. Characterization of Profilin and Polcalcin Panallergens From Ash Pollen. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2014 November; 24(4).
  43. Charpin , Pichot , Belmonte , Sutra JP, Zidkova J, Chanez , et al. Cypress pollinosis: from tree to clinic. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2019; 56(2): p. 174--195.
  44. Schein H, Ivanciuc O, Braun W. Bioinformatics approaches to classifying allergens and predicting cross-reactivity. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2007; 27(1): p. 1-27.
  45. Lockey F, Ledford DK. Allergens and Allergen Immunotherapy: Subcutaneous, Sublingual, and Oral } : CRC press; 2020.
  46. Consortium, The UniProt. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*. 2019 January; 47(D1): p. D506--D515.
  47. Carmen del Vennera , Picado C. Patologías mediadas por la inmunoglobulina E: de la inmunoglobulina E al omalizumab. *Inmunología*. 2012 December; 31(4): p. 119--126.
  48. Sabban S. Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity FcεRI receptor: University of Sheffield; 2011.
  49. Paul WE. *Fundamental immunology*: Wolters Kluwer; 2008.
  50. Schlessinger, , Schlessinger A, Rost B. Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes. *The Journal of Immunology*. 2008; 181(9): p. 6230--6235.
  51. Bokka S, Veeramachaneni K, Thunuguntla VBSC, Manda K, Bondili S. Specific panallergen peptide of Sorghum Polcalcin showing IgE response identified based on in silico and in vivo peptide mapping. *Bioscience Reports*. 2019 November; 39(11).
  52. Schroeder J, Harry W, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125(2): p. S41--S52.
  53. Peng C, Cardenas , Rifas-Shiman SL, Hivert MF, Gold DR, Platts-Mills TA, et al. Epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E in children: a life course approach. *Clinical epigenetics*. 2018; 10(1): p. 1-14.
  54. Ramachandran KI, Deepa G, Namboori K. *Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications* Media SSB, editor.; 2008.
  55. Robinson, SW, Afzal AM, Leader DP. *Bioinformática: conceptos, métodos y datos*. 2014; : p. 259--287.
  56. Karplus M, McCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*. 2002 September 01; 9(9): p. 646-652.
  57. Frenkel D, Smit B. *Understanding molecular simulation: From algorithms to applications*. Computational sciences series. 2002; 1: p. 1--638.
  58. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*. 2018; 99(6): p. 1129--1143.
  59. Sebastián Yagüe Á, Pascual-García A, Abascal F, Aguirre J, Bajic D, Baú D, et al. "Bioinformática con Ñ v1. 0": a collaborative project of young Spanish scientists to write a complete book about Bioinformatics.; 2014.
  60. Prieto-Martínez F, Arciniega M, Medina-Franco JL. Acoplamiento molecular: avances recientes y retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2019; 21(S1): p. 65-87.
  61. Coordinators NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*. 2016 January 04; 44(D1): p. D7--D19.
  62. O'Leary A, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*. 2016 January 04; 44(D1): p. D733--D745.



63. Pomés , Davies JM, Gadermaier G, Hilger C, Holzhauser T, Lidholm J, et al. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Molecular immunology*. 2018 August 04; 100: p. 3–13.
64. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*. 1995; 91(1-3): p. 43–56.
65. Yang J, Yan , Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*. 2015 January; 12(1): p. 7-8.
66. Yang , Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research*. 2015 July 01; 43(W1): p. W174–W181.
67. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000 January; 28(1): p. 235–242.
68. Wu S, Skolnick J, Zhang Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC biology*. 2007 May 08; 5: p. 17-17.
69. Xu D, Zhang Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophysical journal*. 2011 November 16; 101(10): p. 2525–2534.
70. Søndergaard CR, Olsson MHM, Rostkowski , Jensen JH. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2011 July; 7(7): p. 2284–2295.
71. Olsson MHM, Søndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2011 February 08; 7(2): p. 525–537.
72. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2004; 25(13): p. 1605–1612.
73. Humphrey , Dalke , Schulten K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996; 14(1): p. 33–38.
74. Chen VB, Arendall WB3, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. 2010 January; 66(Pt 1): p. 12–21.
75. Dennington R, Keith TA, Millam JM. GaussView, version 6. Shawnee Mission KS. 2019.
76. Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*. 2008 December 02; 9(1): p. 514.
77. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson. HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic acids research*. 2005; 33(suppl\ \_2): p. W363–W367.
78. Mashiach E, Schneidman-Duhovny D, Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic acids research*. 2008; 2008: p. W229–W232.
79. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand--protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2011; 10(51): p. 2778--2786.
80. Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Science*. 2018; 27(1): p. 129-134.
81. Kumari R, Kumar R, Open Source Drug Discovery Consortium , Lynn A. g\_mmpbsa □ A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of chemical information and modeling*. 2014; 54(7): p. 1951--1962.
82. Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and



- reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *Journal of Physical Chemistry B*. 2001 July 19; 105(28): p. 6474–6487.
83. Abascal JLF, Vega C. A general purpose model for the condensed phases of water: TIP4P/2005. *The Journal of Chemical Physics*. 2005; 123(23).
  84. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods of protein structure comparison*. 2012; 857.
  85. Abraham MJ, van der Spoel D, Lindahl E, Hess , development team, GROMACS. *GROMACS: Reference Manual*. 7th ed.: GROMACS; 2018.
  86. Martín-Santamaría S. *Computational tools for chemical biology*: Royal Society of Chemistry; 2017.
  87. Mitropoulou AN, Bowen H, Dodev TS, Davies AM, Bax HJ, Beavil RL, et al. Structure of a patient-derived antibody in complex with allergen reveals simultaneous conventional and superantigen-like recognition}. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018; 115(37): p. E8707--E8716.
  88. Yang , Wang Y, Zhang Y. ResQ: An Approach to Unified Estimation of B-Factor and Residue-Specific Error in Protein Structure Prediction. *Journal of molecular biology*. 2016 February 22; 428(4).
  89. Wu S, Zhang. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic acids research*. 2007; 35(10): p. 3375–3382.
  90. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*. 2008 January 23; 9: p. 40–40.
  91. Wiltgen M. Algorithms for Structure Comparison and Analysis: Homology Modelling of Proteins. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*; Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K., Schönbach, C., Eds. 2018 October; 01: p. 38-61.
  92. Richardson JS. *The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure* Anfinsen , Edsall JT, Richards FM, editors.: Academic Press; 1981.
  93. Sibanda BL, Blundell TL, Thornton JM. Conformation of  $\beta$ -hairpins in protein structures: A systematic classification with applications to modelling by homology, electron density fitting and protein engineering. *Journal of Molecular Biology*. 1989; 206(4): p. 759-777.
  94. Pal , Basu G, Chakrabarti P. Variants of 310-helices in protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2002; 48(3): p. 571-579.
  95. Karpen ME, De Haseth PL, Neet KE. Differences in the amino acid distributions of 310-helices and  $\alpha$ -helices. *Protein Science*. 1992; 1(10): p. 1333-1342.
  96. Chou KC, Maggiora GM, Némethy G, Scheraga HA. Energetics of the structure of the four-alpha-helix bundle in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988; 85(12): p. 4295--4299.
  97. Chakrabarti P. Does helix dipole have any role in binding metal ions in protein structures? *Archives of biochemistry and biophysics*. 1991; 290(2): p. 387--390.
  98. Kawasaki H, Kretsinger RH, Moncrief ND, M. G, Nakayama S, Heizmann CW, et al. *ExPASy*. 2006 April..
  99. Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ. Structures and metal-ion-binding properties of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding helix--loop--helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal*. 2007; 405(2): p. 199--221.
  100. Borisenko V, Sansom MSP, Woolley GA. Protonation of lysine residues inverts cation/anion selectivity in a model channel. *Biophysical journal*. 200; 78(3): p. 1335--1348.
  101. Fox T, Kollman PA. The application of different solvation and electrostatic models in molecular dynamics simulations of ubiquitin: How well is the x-ray structure “maintained”? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1996; 25(3): p. 315--334.
  102. Valenta , Karaulov A, Niederberger V, Zhernov Y, Elisyutina O, Campana R, et al. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? *The journal of*

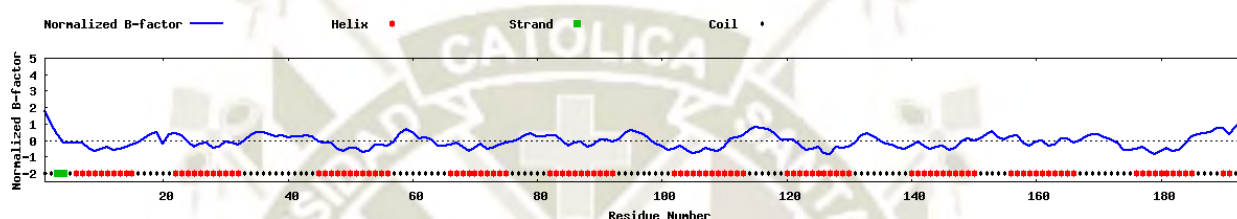
allergy and clinical immunology. In practice. 2018; 6(6): p. 1845-1855.e2.

103. Shoormasti S, Fazlollahi MR, Kazemnejad A, Movahedi M, Tayebi B, Yazdanyar Z, et al. Accuracy of immunoblotting assay for detection of specific IgE compared with ImmunoCAP in allergic patients. Electronic physician. 2018; 10(2): p. 6327.



# APÉNDICE

## A. MODELADO



**Figura A.1:** Alineamiento del Factor B Normalizado predicho.

**Tabla A.1:** Las 10 mejores plantillas utilizadas por I-TASSER para la construcción de la polcalcina Jun o 2. Las columnas Iden1 e Iden2 son los porcentajes de identidad de secuencia en la región alineada y sobre toda la cadena respectivamente. Cov es la cobertura de alineamiento y Z-score normalizado es el puntaje que se le da al alineamiento.

Rango	PDB	Iden1	Iden2	Cov	Z-Score norm.
1	4i2yA	0.36	0.34	0.87	2.34
2	1ncxA	0.32	0.29	0.81	2.36
3	1prwA	0.4	0.33	0.76	2.62
4	3fwb	0.27	0.24	0.79	0.81
5	3i7b	0.28	0.34	0.95	0.66
6	4i2yA	0.38	0.34	0.84	2.09
7	4ik1A	0.34	0.34	0.94	3.4
8	4tncA	0.33	0.29	0.81	2.24
9	1clmA	0.41	0.31	0.74	2.33
10	21mtA	0.34	0.31	0.74	2.49

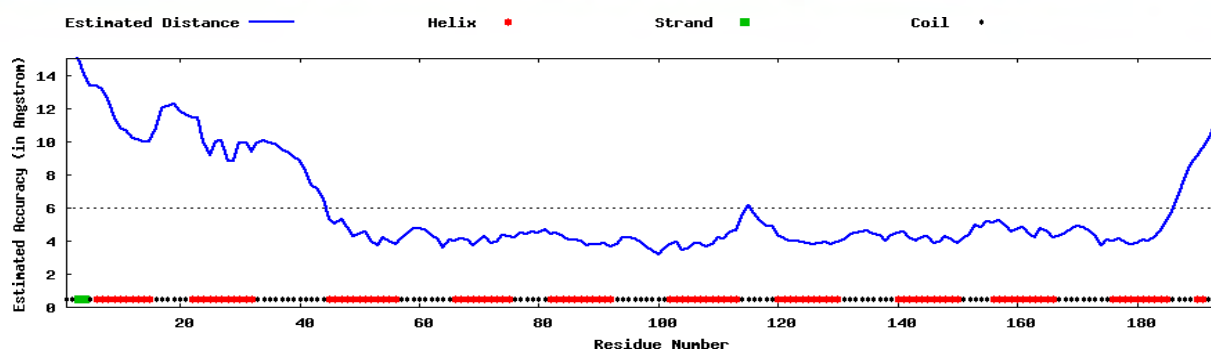




**Figura A.2:** Alineamiento de las 10 mejores plantillas. Imagen obtenida del servidor I-TASSER

**Tabla A.2:** Predicción de los 5 sitios posibles para la unión a ligandos. Tabla obtenida del servidor I-TASSER.

Rango	C-score	Tamaño del clúster	PDB	Ligando	Residuos del sitio de unión del ligando
1	0.35	50	2be6A	Péptido	48,49,51,52,55,56,69,78,88,92,100, 105,108,109,112,113,122,123,125,12 6,129,130,146,147,150,152,158,161,1 62,165,166,179,182,183
2	0.08	16	2hq8A	CA	93,95,97,99,104
3	0.08	17	4n1gA	CA	131,133,135,137,142
4	0.08	11	2be6B	Péptido	49,52,55,56,69,76,88,92,100,108,109, 112, 113, 122, 123, 130, 183
5	0.04	9	1qtxA	Péptido	47,48,49,51,52,54,55,56,73,76,78,88, 105,108,109,111,122,126,129,143,14 7,150,152,162,165,166, 181,182,183,184,188



**Figura A.3:** Gráfica ResQ, obtenida del servidor I-TASSER. La línea azul indica la desviación de la distancia entre las posiciones de residuos en el modelo y la estructura nativa. Los cuadrados rojos simbolizan las formas  $\alpha$ -hélice; los verdes, los  $\beta$ -strand y los negros, el coil.

**Tabla A.3:** Resumen de una Hoja  $\beta$  o  $\beta$  - Sheet encontrada en la polcalcina. Obtenido de PDBSum.

Hoja	Nº de Strand	Tipo	Barril	Topología
A	2	Antiparalelo	N	1

**Tabla A.4:** Datos obtenidos para la horquilla  $\beta$  encontrada en la polcalcina. Obtenido de PDBSum.

Strand 1			Strand 2		
Inicio	Final	Longitud	Inicio	Final	Longitud
Ile138	Ser139	2	Leu173	Leu174	2

**Tabla A.5:** Resumen de las dos  $\beta$ -strands encontradas en la estructura. Obtenido de PDBSum.

Nº	Inicio	Final	Hoja	Nº Residuo
1	Ile138	Ser139	A	2
2	Leu173	Ile174	A	2



**Tabla A.6:**  $\alpha$ -hélices encontradas en la estructura de la polcalcina. Obtenido de PDBSum

N°	Inicio	Final	Tipo	N° de residuos	Longitud (Å)	Secuencia
1	Ala28	Ala31	G	4	6.11	APAA
2	Ala45	Arg54	H	10	15.46	AEEEMARVFR
3	Ser67	Leu76	H	10	15.97	SELAALFES
4	Asp82	Ala92	H	11	17.03	DDEVARMMAEA
5	Leu102	Phe105	H	4	6.24	LPEF
6	Ala106	Leu108	G	3		AAL
7	Glu120	Arg124	H	5	8.24	EEDLR
8	Phe127	Val129	G	3		FRV
9	Ala140	Ser149	H	10	15.22	AAELARVLRS
10	Cys159	Gly165	G	7	12.83	CRRMIEG
11	Phe176	Ala184	H	9	13.76	FDEFKVMMA
12	Ala188	Phe190	G	3		ACF

**Tabla A.7:** Datos de las 13 interacciones Hélice-Hélice que existe en la polcalcina. Obtenido de PDBSum

Hélices		Tipo de Hélices		Tipo de Interacción		Longitud Å	N° Resid. de Interac.		
							Total	Hélice 1	Hélice 2
1	2	G	H	N	I	8.5	2	2	1
1	3	G	H	I	I	10.2	6	2	4
1	4	G	H	C	I	11.6	1	1	1
1	5	G	H	I	C	10.1	2	2	1
2	5	H	H	I	I	9.5	8	5	3
3	4	H	H	I	I	9.7	8	3	3
3	5	H	H	N	N	14.3	1	1	1
3	9	H	H	c	c	4.6	5	3	2
4	5	H	H	C	I	8.4	2	1	2
7	11	H	H	I	I	11	7	3	4
9	10	H	G	I	N	7.5	10	4	4
9	11	H	H	I	N	13.5	2	2	1
10	11	G	H	I	I	10.6	2	2	2



**Tabla A.8:** Información sobre los 23 giros  $\beta$  que son generados en el modelamiento de la polcalcina. Obtenido de PDBSum.

Giro	Secuencia	Tipo de Giro	Enlace de Hidrógeno
Lys3-Met6	KIRM	I	Si
Arg5-Val8	RMPV	IV	
Ser10-Arg13	SLFR	I	
Leu11-Arg14	LFRR	I	
Phe12-Arg15	FRRR	I	
Arg15-Lys18	RSSK	VIII	
Pro20-Gln23	PPPQ	IV	
Gln23-Gln26	QPQQ	II	Si
Gln25-Ala28	QQQA	I	Si
Arg42-Ala45	RATA	IV	Si
Arg54-Asp57	RKFD	IV	
Lys55-Ala58	KFDA	VIII	
Asp93-Gly96	DADG	IV	
Asp95-Gly98	DGDG	IV	
Leu108-Thr111	LNAT	IV	
Asn109-Val112	NATV	I	Si
Ala110-Ala113	ATVA	I	
Arg124-Phe127	RHAF	I	
Val129-Ala132	VFDA	IV	
Asp131-Gly134	DADG	IV	
Ser155-Gln158	SVAQ	IV	Si
Val156-Cys159	VAQC	IV	
Ala184-Gly187	ARGG	IV	

**Tabla A.9:** Datos sobre el único giro  $\gamma$  encontrado en la polcalcina. Obtenido de PDBSum.

Inicio	Final	Secuencia	Tipo de Giro	Residuo i+1		
				Phi	Psi	Chi1
Val8	Ser10	VPS	Inverso	-87.3	51.8	30.4

**Tabla A.10:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 10. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
867	CG	ASP57	2814	CA195	2,72	2,77
868	OD1	ASP57	2814	CA195	2,83	
869	OD2	ASP57	2814	CA195	1,88	
889	CG	ASN59	2814	CA195	3,51	3,37
890	OD1	ASN59	2814	CA195	2,72	
891	ND2	ASN59	2814	CA195	3,89	
910	CG	ASP61	2814	CA195	3,84	3,54
911	OD1	ASP61	2814	CA195	3,54	
912	OD2	ASP61	2814	CA195	3,23	
945	O	ARG63	2814	CA195	3,39	3,39

**Tabla A.11:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 13. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
932	CD	ARG63	2815	CA196	3,17	3,49
935	NE	ARG63	2815	CA196	3,54	
937	CZ	ARG63	2815	CA196	3,7	
938	NH1	ARG63	2815	CA196	3,53	
1388	CG	ASP95	2815	CA196	3,73	3,21
1390	OD2	ASP95	2815	CA196	2,68	
1404	CB	ASP97	2815	CA196	3,68	3,68
1419	N	PHE99	2815	CA196	3,41	3,36
1421	CA	PHE99	2815	CA196	3,56	
1437	C	PHE99	2815	CA196	3,53	
1438	O	PHE99	2815	CA196	2,87	
1423	CB	PHE99	2815	CA196	2,9	
1426	CG	PHE99	2815	CA196	3,88	

**Tabla A.12:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 2. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
1923	CB	ASP133	2816	CA197	3,82	3,82
1945	OG	SER135	2816	CA197	3,71	3,71

**Tabla A.13:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 15. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
2413	CG	ASP167	2817	CA198	3,52	3,25
2414	OD1	ASP167	2817	CA198	3,84	
2415	OD2	ASP167	2817	CA198	2,39	
2435	N	ASN169	2817	CA198	3,44	3,24
2437	CA	ASN169	2817	CA198	3,21	
2447	C	ASN169	2817	CA198	2,63	
2448	O	ASN169	2817	CA198	3,68	
2439	CB	ASN169	2817	CA198	3,23	
2449	N	GLY170	2817	CA198	1,5	2,44
2451	CA	GLY170	2817	CA198	2,12	
2454	C	GLY170	2817	CA198	2,54	
2455	O	GLY170	2817	CA198	3,61	
2456	N	ASP171	2817	CA198	2,46	3,15
2458	CA	ASP171	2817	CA198	3,84	
2568	OE2	GLY172	2817	CA198	3,89	3,89

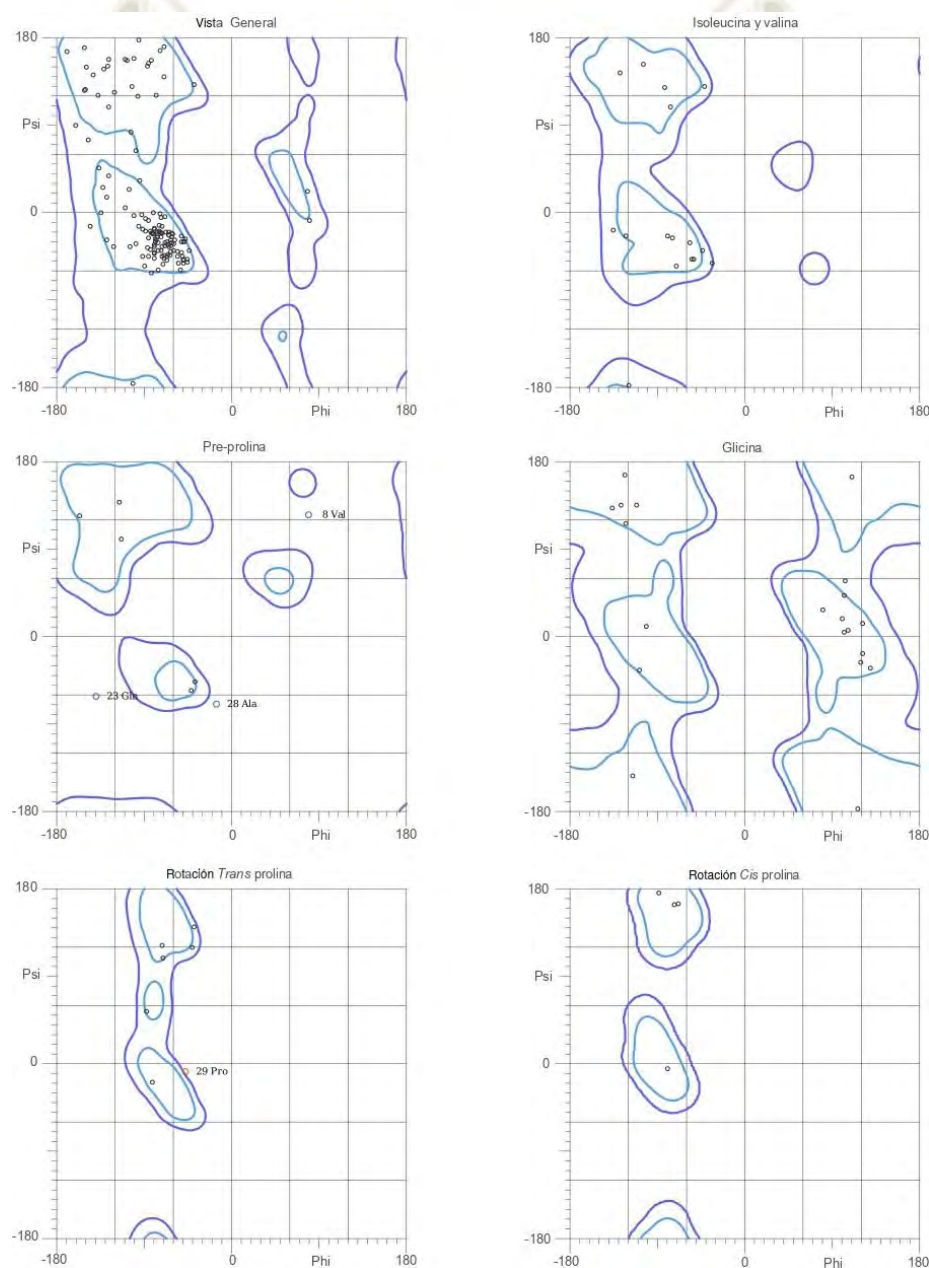


## B. ANÁLISIS DE LOS ESTADOS DE PROTONACIÓN EN EL SOFTWARE GROMACS

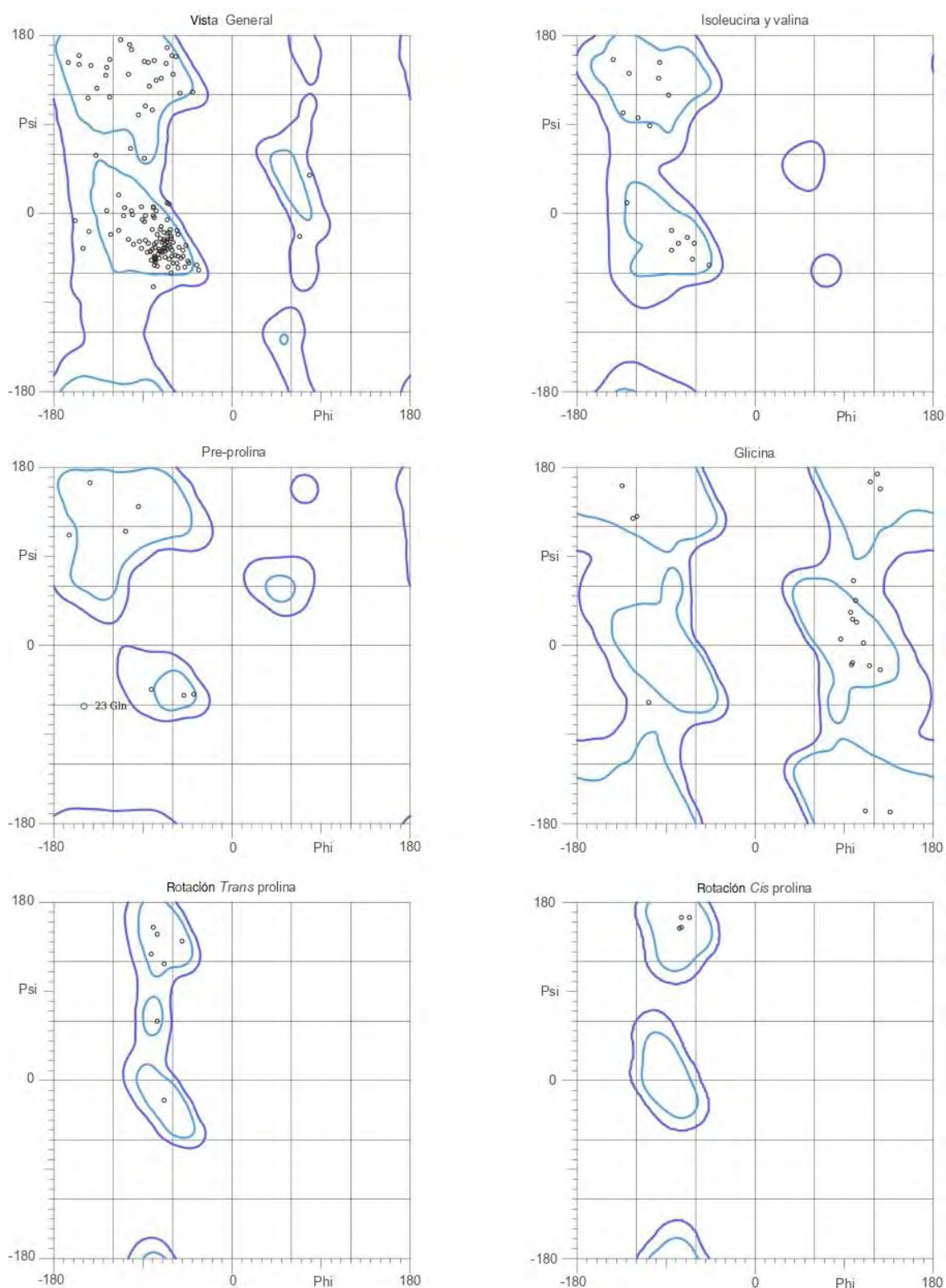
**Tabla B.1:** Aminoácidos con más altas fluctuaciones en el bucle.

Tipo	bA	bB	bC	bD
DG	Gly60	Phe99	Asp133, Ser135	Gln168
PG	Gly60, Arg63	Asp95, Asp97	Asp133	Glu164, Gln168

### 1. Graficas del análisis por Ramachandran



**Figura B.1:** Diagrama de Ramachandran sin declaración de la protonación a pH neutro, simulación DG. Obtenido del servidor MolProbity.



**Figura B.2:** Diagrama de Ramachandran a pH 7 con declaración de protonación, simulación PG. Obtenido del servidor MolProbity.



## 2. Distancia del calcio en la simulación DG

**Tabla B.2:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 11. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
867	CG	ASP57	2814	CA195	2,69	2,41
868	OD1	ASP57	2814	CA195	2,31	
869	OD2	ASP57	2814	CA195	2,22	
889	CG	ASN59	2814	CA195	3,48	3,30
890	OD1	ASN59	2814	CA195	2,53	
891	ND2	ASN59	2814	CA195	3,88	
910	CG	ASP61	2814	CA195	2,65	2,41
911	OD1	ASP61	2814	CA195	2,22	
912	OD2	ASP61	2814	CA195	2,35	
944	C	ARG63	2814	CA195	3,76	3,16
945	O	ARG63	2814	CA195	2,56	

**Tabla B.3:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 5. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
1388	CG	ASP95	2815	CA196	2,71	2,45
1389	OD1	ASP95	2815	CA196	2,37	
1390	OD2	ASP95	2815	CA196	2,28	
1407	CG	ASP97	2815	CA196	3,28	2,74
1408	OD1	ASP97	2815	CA196	2,2	

**Tabla B.4:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 5. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
1923	CB	ASP133	2816	CA197	3,65	3,03
1926	CG	ASP133	2816	CA197	3,22	
1928	OD2	ASP133	2816	CA197	2,21	
1942	CD	SER135	2816	CA197	3,53	3,00
1945	OG	SER135	2816	CA197	2,47	



**Tabla B.5:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 9. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
2410	CB	ASP167	2817	CA198	3,82	2,77
2413	CG	ASP167	2817	CA198	2,65	
2414	OD1	ASP167	2817	CA198	2,33	
2415	OD2	ASP167	2817	CA198	2,28	
2492	C	LEU173	2817	CA198	3,65	3,07
2493	O	LEU173	2817	CA198	2,48	
2566	CD	GLU178	2817	CA198	3,16	2,93
2567	OE1	GLU178	2817	CA198	2,27	
2568	OE2	GLU178	2817	CA198	3,37	

## C. ESTADOS DE PROTONACIÓN DE LOS RESIDUOS EN LA POLCALCINA JUN O 2 y LA IGE

**Tabla C.1:** Protonación a los diferentes pH de la polcalcina *Jun o 2*.

	ASP			GLU			HIS		
	Residuo	Posición	Bucle	Residuo	Posición	Bucle	Residuo	Posición	Bucle
<b>pH 5</b> Carga = -5 e <sup>-</sup> .	ASP	33	NO	GLU	41	NO	HIP	78	NO
	ASP	35	NO	GLU	46	NO	HIP	125	NO
	ASH	57	SI	GLU	47	NO			
	ASP	61	SI	GLU	48	NO			
	ASP	82	NO	GLH	68	NO			
	ASP	83	NO	GLU	74	NO			
	ASP	93	SI	GLU	84	NO			
	ASP	95	SI	GLU	91	NO			
	ASP	97	SI	GLU	104	NO			
	ASP	115	NO	GLU	120	NO			
	ASP	122	NO	GLU	121	NO			
	ASP	131	SI	GLU	142	NO			
	ASP	133	SI	GLU	152	NO			
	ASP	167	SI	GLU	164	NO			
	ASP	171	SI	GLU	178	NO			
	ASP	177	NO	GLU					
<b>pH 6</b> Carga = -7 e <sup>-</sup> .	ASP	33	NO	GLU	41	NO	HIP	78	NO
	ASP	35	NO	GLU	46	NO	HIP	125	NO
	ASP	57	SI	GLU	47	NO			
	ASP	61	SI	GLU	48	NO			
	ASP	82	NO	GLU	68	NO			
	ASP	83	NO	GLU	74	NO			
	ASP	93	SI	GLU	84	NO			
	ASP	95	SI	GLU	91	NO			
	ASP	97	SI	GLU	104	NO			
	ASP	115	NO	GLU	120	NO			
	ASP	122	NO	GLU	121	NO			
	ASP	131	SI	GLU	142	NO			
	ASP	133	SI	GLU	152	NO			
	ASP	167	SI	GLU	164	NO			
	ASP	171	SI	GLU	178	NO			
	ASP	177	NO						
<b>pH 7</b> Carga = -9 e <sup>-</sup> .	ASP	33	NO	GLU	41	NO	HID	78	NO
	ASP	35	NO	GLU	46	NO	HID	125	NO
	ASP	57	SI	GLU	47	NO			
	ASP	61	SI	GLU	48	NO			
	ASP	82	NO	GLU	68	NO			
	ASP	83	NO	GLU	74	NO			
	ASP	93	SI	GLU	84	NO			
	ASP	95	SI	GLU	91	NO			
	ASP	97	SI	GLU	104	NO			
	ASP	115	NO	GLU	120	NO			
	ASP	122	NO	GLU	121	NO			
	ASP	131	SI	GLU	142	NO			
	ASP	133	SI	GLU	152	NO			
	ASP	167	SI	GLU	164	NO			
	ASP	171	SI	GLU	178	NO			
	ASP	177	NO	GLU					

**Tabla C.2:** Protonación a los diferentes pH de la Inmunoglobulina E

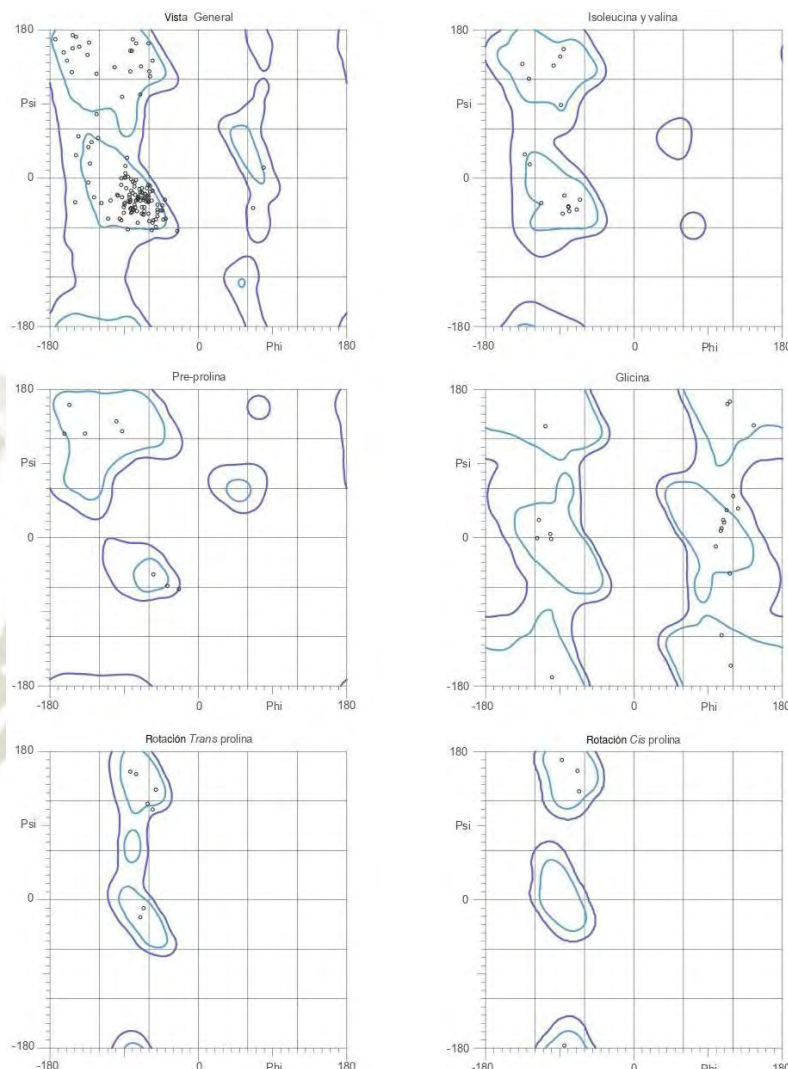
pH	Cadena	ASP		GLU		HIS	
		AA	Posición	AA	Posición	AA	Posición
5 Carga = 20 e <sup>-</sup>	C	ASP	34	GLU	83	HIE	36
		ASP	62	GLH	85	HIP	193
		ASP	84	GLU	128	HIP	202
		ASP	87	GLH	129		
		ASP	94	GLU	165		
		ASP	143	GLU	188		
		ASP	156	GLU	203		
				GLU	208		
				GLU	215		
		ASP	54	GLU	10	HIE	35
	D	ASP	73	GLU	46	HIP	43
		ASP	82	GLU	89	HIP	65
		ASP	90	GLH	156	HIP	172
		ASP	109	GLU	220	HIP	208
		ASP	152			HIP	225
		ASP	216			HIP	226
						HIP	227
						HIP	228
						HIP	229
						HIE	230
6 Carga = 14 e <sup>-</sup>	C	ASP	34	GLU	83	HIE	36
		ASP	62	GLU	85	HIP	193
		ASP	84	GLU	128	HIE	202
		ASP	87	GLU	129		
		ASP	94	GLU	165		
		ASP	143	GLU	188		
		ASP	156	GLU	203		
				GLU	208		
				GLU	215		
	D	ASP	54	GLU	10	HIE	35
		ASP	73	GLU	46	HID	43
		ASP	82	GLU	89	HIP	65
		ASP	90	GLU	156	HID	172
		ASP	109	GLU	220	HIP	208
		ASP	152			HIP	225
		ASP	216			HID	226
						HIP	227
						HIP	228
						HIP	229
						HIP	230
7 Carga = 9 e <sup>-</sup>	C	ASP	34	GLU	83	HIE	36
		ASP	62	GLU	85	HIP	193
		ASP	84	GLU	128	HIE	202
		ASP	87	GLU	129		
		ASP	94	GLU	165		
		ASP	143	GLU	188		
		ASP	156	GLU	203		
				GLU	208		
				GLU	215		
	D	ASP	54	GLU	10	HIE	35
		ASP	73	GLU	46	HID	43
		ASP	82	GLU	89	HID	65
		ASP	90	GLU	156	HID	172
		ASP	109	GLU	220	HIE	208
		ASP	152			HIP	225
		ASP	216			HID	226
						HID	227
						HID	228
						HIE	229
						HIP	230



## D. DINÁMICA MOLECULAR

### 1. pH5

**Figura D.1:** Diagrama de Ramachandran a pH 5. Obtenido del servidor MolProbity.



**Tabla D.2:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 10. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
867	CG	ASP57	2814	CA195	2,79	2,52
868	OD1	ASP57	2814	CA195	2,37	
869	OD2	ASP57	2814	CA195	2,4	
889	CG	ASN59	2814	CA195	3,37	3,15
890	OD1	ASN59	2814	CA195	2,36	
891	ND1	ASN59	2814	CA195	3,72	
910	CG	ASP61	2814	CA195	2,59	2,32
911	OD1	ASP61	2814	CA195	2,18	
912	OD2	ASP61	2814	CA195	2,19	
945	O	ARG63	2814	CA195	2,93	2,93

**Tabla D.2** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 6. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
1388	CG	ASP95	2816	CA196	2,81	2,53
1389	OD1	ASP95	2816	CA196	2,4	
1390	OD2	ASP95	2816	CA196	2,37	
1407	CG	ASP97	2816	CA196	2,76	2,50
1408	OD1	ASP97	2816	CA196	2,26	
1409	OD2	ASP97	2816	CA196	2,47	

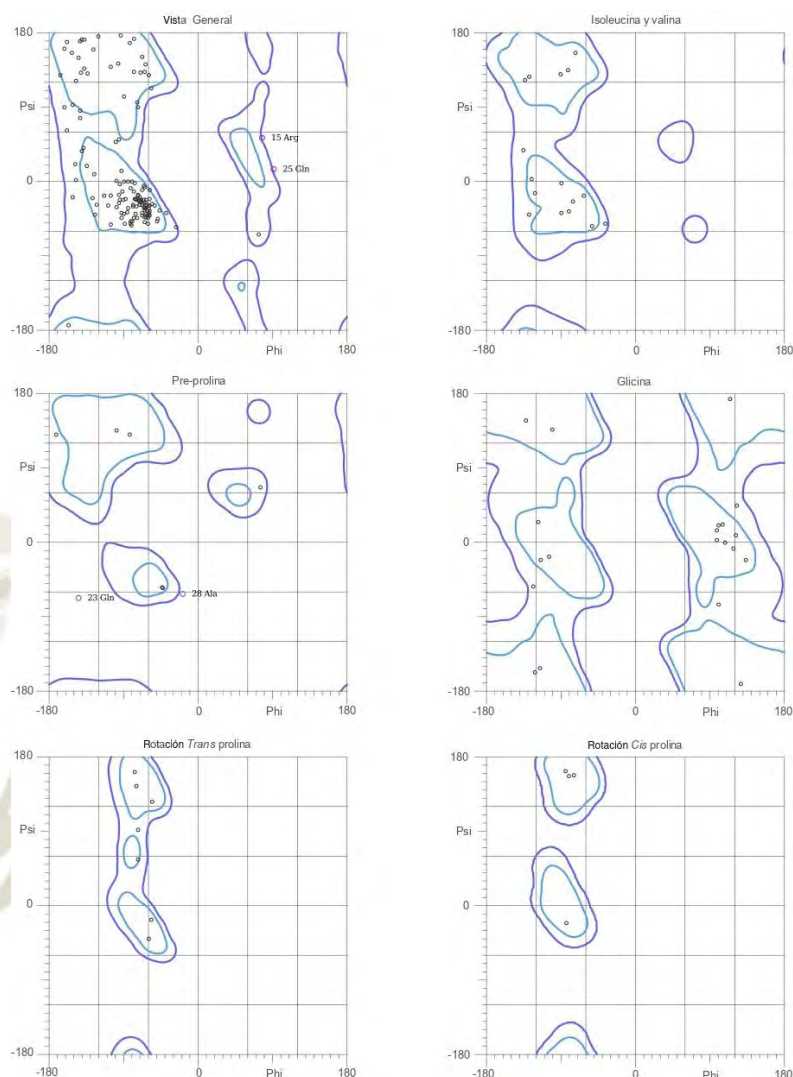
**Tabla D.3:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 6. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
1926	CG	ASP133	2817	CA197	2,73	2,48
1927	OD1	ASP133	2817	CA197	2,23	
1928	OD2	ASP133	2817	CA197	2,49	
2026	CD	GLU142	2817	CA197	2,73	2,48
2027	OE1	GLU142	2817	CA197	2,29	
2028	OE2	GLU142	2817	CA197	2,42	

**Tabla D.4:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos: 11. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
2413	CG	ASP167	2818	CA198	3,31	2,76
2414	OD1	ASP167	2818	CA198	2,2	
2442	CB	ASN169	2818	CA198	3,89	3,89
2443	CG	ASP171	2818	CA198	2,79	2,54
2463	OD1	ASP171	2818	CA198	2,34	
2464	OD2	ASP171	2818	CA198	2,50	
2465	C	LEU173	2818	CA198	3,49	2,96
2492	O	LEU173	2818	CA198	2,43	
2493	CD	GLU178	2818	CA198	2,62	2,40
2566	OE1	GLU178	2818	CA198	2,27	
2567	OE2	GLU178	2818	CA198	2,3	

## 2. pH6



**Figura D.2:** Diagrama de Ramachandran a pH 6. Obtenido del servidor MoProbit.

**Tabla D.5:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 11. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
867	CG	ASP57	2816	CA195	2,74	2,43
868	OD1	ASP57	2816	CA195	2,26	
869	OD2	ASP57	2816	CA195	2,29	
889	CG	ASN59	2816	CA195	3,42	3,19
890	OD1	ASN59	2816	CA195	2,44	
891	ND2	ASN59	2816	CA195	3,71	
910	CG	ASP61	2816	CA195	2,78	2,46
911	OD1	ASP61	2816	CA195	2,33	
912	OD2	ASP61	2816	CA195	2,28	
944	C	ARG63	2816	CA195	3,6	3,01
945	O	ARG63	2816	CA195	2,42	



**Tabla D.6:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 5. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
1389	CG	ASP95	2817	CA196	2,69	2,42
1390	OD1	ASP95	2817	CA196	2,32	
1391	OD2	ASP95	2817	CA196	2,26	
1408	CG	ASP97	2817	CA196	3,27	2,71
1410	OD2	ASP97	2817	CA196	2,14	

**Tabla D.7:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 3. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
1928	CG	ASP133	2818	CA197	2,75	2,49
1929	OD1	ASP133	2818	CA197	2,37	
1930	OD2	ASP133	2818	CA197	2,35	

**Tabla D.8:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 13. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1			Átomo 2		Distancia	Promedio
Nº Átomo	Átomo	Residuo	Nº Átomo	Residuo		
2415	CG	ASP167	2819	CA198	2,64	2,42
2416	OD1	ASP167	2819	CA198	2,46	
2417	OD2	ASP167	2819	CA198	2,15	
2444	CG	ASN169	2819	CA198	3,47	2,90
2445	OD1	ASN169	2819	CA198	2,33	
2465	CG	ASP171	2819	CA198	3,37	3,16
2466	OD1	ASP171	2819	CA198	2,31	
2467	OD2	ASP171	2819	CA198	3,81	
2494	C	LEU173	2819	CA198	3,34	2,77
2495	O	LEU173	2819	CA198	2,19	
2568	CD	GLU178	2819	CA198	2,71	2,44
2569	OE1	GLU178	2819	CA198	2,42	
2570	OE2	GLU178	2819	CA198	2,19	

## E. EPÍTOPOS

### 1. pH 5

#### a) Lineal

**Tabla E.1:** Epítomos de la polcalcina Jun o 2 a pH 5. \*Epítomos que concuerdan con la zona donde se ubica el calcio. Datos obtenidos de ElliPro.

Rango	Inicio - Final	AA	Cantidad de Resid.	Puntaje
1	1 - 18	MGKIRMPVPSLFRRRSSK	18	0.79
2	57 - 70	DANGDGRISRSELA	14	0.68
3	187 - 194	GACFAKIA	8	0.67
4*	164 - 180	EGVDQNGDGLISFDEFKV	18	0.66
5	34 - 47	GDGSGSPERATAEE	14	0.65
6	77 - 83	GHGASDD	7	0.64
7	90 - 105	AEADADGDGFISLPEF	16	0.61
8	114 - 121	GDAAAVEE	8	0.57
9*	133 - 137	DGSGA	5	0.54

#### b) Discontinuos

**Tabla E.2:** Epítomos discontinuos de la polcalcina Jun o 2 a pH 5. \*Epítomos que concuerdan con la zona donde se ubica el calcio. Datos obtenidos de ElliPro.

Nº	Residuos	Cantidad de Resid.	Puntaje
1	:M1, _:G2, _:K3, _:I4, _:M6, _:P7, _:V8, _:P9, _:S10, _:L11, _:F12, _:R13, _:R14, _:S16, _:S17, _:K18, _:P19, _:E74, _:G77, _:H78, _:G79, _:A80, _:D82, _:D83, _:R87, _:G151, _:P153	27	0,71
2	_:D33, _:G34, _:D35, _:G36, _:S37, _:G38, _:S39, _:P40, _:E41, _:R42, _:A43, _:T44, _:E46, _:E47, _:R51, _:D57, _:A58, _:N59, _:G60, _:D61, _:G62, _:R63, _:S65, _:S67, _:E68, _:L69, _:A70, _:A90, _:E91, _:D93, _:A94, _:D95, _:G96, _:D97, _:G98, _:F99, _:S101, _:L102, _:P103, _:E104, _:A106, _:A107, _:A113, _:G114, _:D115, _:A116, _:A117, _:A118, _:V119, _:E120, _:D131, _:D133, _:G134, _:S135, _:G136, _:A137, _:E164, _:G165, _:V166, _:D167, _:Q168, _:N169, _:G170, _:D171, _:G172, _:L173, _:I174, _:S175, _:D177, _:E178, _:K180, _:V181, _:G187, _:A188, _:C189, _:F190, _:A191, _:K192, _:I193, _:A194	80	0,64
3	:A154, _:S155, _:V156, _:A157, _:R160, _:R161	6	0,58

## 2. pH 6

### a) Lineal

**Tabla E.3:** Epítomos de la polcalcina Jun o 2 a pH 6. Datos obtenidos de ElliPro.

Rango	Inicio - Final	AA	Cantidad de Resid.	Puntaje
1	34 - 47	GDGSGSPERATAEE	14	0.74
2	1 - 10	MGKIRMPVPS	10	0.71
3	189 - 194	CFAKIA	6	0.70
4	76 - 100	LGHGASDDEVARMMAEADAD GDGFI	25	0.69
5	130 - 142	FDADGSGAISAAE	13	0.64
6	160 - 181	RRMIEGVDQNGDGLISFDEFKV	22	0.61
7	115 - 121	DAAAVEE	7	0.58
8	57 - 66	DANGDGRISR	10	0.57

### b) Discontinuos

**Tabla E.4:** Epítomos discontinuos de la polcalcina Jun o 2 a pH 6. Datos obtenidos de ElliPro.

N°	Residuos	N° Residuos	Puntaje
1	_E120, _E121, _R124	3	0,70
2	_G34, _D35, _G36, _S37, _G38, _S39, _P40, _E41, _R42, _A43, _T44, _A45, _E46, _D57, _A58, _N59, _G60, _D61, _G62, _R63, _S101, _P103, _A110, _T111	24	0,67
3	_M1, _G2, _K3, _I4, _R5, _M6, _P7, _V8, _P9, _S10, _R14, _S65, _R66, _E74, _L76, _G77, _H78, _G79, _A80, _S81, _D82, _D83, _E84, _V85, _A86, _R87, _M88, _M89, _A90, _E91, _A92, _D93, _A94, _D95, _G96, _D97, _G98, _F99, _D115, _A116, _A117, _A118, _F130, _D131, _A132, _D133, _G134, _S135, _G136, _A137, _I138, _S139, _A140, _A141, _E142, _R145, _P153, _A154, _S155, _V156, _A157, _R160, _I163, _E164, _V166, _D167, _Q168, _N169, _G170, _D171, _G172, _L173, _I174, _S175, _F176, _D177, _E178, _K180, _V181, _A184, _R185, _G187, _A188, _C189, _F190, _A191, _K192, _I193, _A194	89	0,64



### 3. pH 7

#### a) Lineal

**Tabla E.9:** Epítomos de la polcalcina Jun o 2 a pH 7. \*Epítomos en el bucle del calcio. Datos obtenidos de ElliPro.

Rango	Inicio - Final	AA	Nº Residuos	Puntaje
1	1 - 8	MGKIRMPV	8	0.82
2*	90 - 99	AEADADGDGF	10	0.78
3	34 - 47	GDGSGSPERATAEE	14	0.70
4*	57 - 63	DANGDGR	7	0.67
5	187 - 194	GACFAKIA	8	0.67
6*	160 - 180	RRMIEGVVDQNGDGLISFDEFK	21	0.66
7	116 - 125	AAAVEEDLRH	10	0.64
8*	128 - 141	RVFDADGSGAISAA	14	0.61

#### b) Discontinuos

**Tabla E.10:** Epítomos discontinuos de la polcalcina Jun o 2 a pH 7. Datos obtenidos de ElliPro.

Nº	Residuos	Nº Residuos	Puntaje
1	_:E120, _:E121, _:R124	3	0,86
2	_:M1, _:G2, _:K3, _:I4, _:R5, _:D57, _:A58, _:N59, _:G60, _:D61, _:G62, _:R63, _:R66, _:E74, _:L76, _:G77, _:H78, _:G79, _:A80, _:S81, _:D82, _:D83, _:E84, _:A86, _:R87, _:A90, _:E91, _:A92, _:D93, _:A94, _:D95, _:G96, _:D97, _:G98, _:F99	35	0,70
3	_:G34, _:D35, _:G36, _:S37, _:G38, _:S39, _:P40, _:E41, _:R42, _:A43, _:T44, _:E46, _:A106, _:A107	14	0,68
4	_:A116, _:A117, _:A118, _:V119, _:D122, _:H125, _:R128, _:D131, _:A132, _:D133, _:G134, _:S135, _:G136, _:A137, _:I138, _:S139, _:A141, _:R145, _:S155, _:V156, _:A157, _:R160, _:R161, _:I163, _:E164, _:G165, _:V166, _:D167, _:Q168, _:N169, _:G170, _:D171, _:G172, _:L173, _:I174, _:S175, _:F176, _:D177, _:E178, _:K180, _:G187, _:A188, _:C189, _:A191, _:K192, _:I193, _:A194	47	0,68
5	_:M6, _:P7, _:V8, _:S10, _:R13, _:R14, _:S16	7	0,55

## F. DOCKING

### 1. Programas para la selección de las soluciones

```
#!/bin/bash
echo Empieza el programa...
cd FD_7/
gfortran -o Polcal Polcal.f
gfortran -o CDR CDR.f
gfortran -o solUNK solUNK.f
./Polcal
for i in {1..10}
do
echo sol_${i}.ref.pdb > num.dat
echo ${i}.pdb >> num.dat
./CDR < num.dat
done
for j in {1..10}
do
echo ${j}.pdb >> numj.dat
done
./solUNK < numj.dat
mv sol_1-10.pdb ../
cp Polcalcina.pdb ../
rm num.dat
rm numj.dat
exit
```

**Figura F.1:** Programa en lenguaje Fortran, que mostrará solo los CDR de las soluciones interactuando con la polcalcina, se tomó como ejemplo el caso del pH 7.

```
PROGRAM CadenasSpike
IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
parameter(maxnat=1000000)
parameter(maxn=100000)
real*8 coorx,coory,coorz,coorxn,cooryn,coorzn
real*8 boxx,boxy,boxz
character*72 lin1,lin2,lin3
character*79 line2
character*1 cad,cad2,cadn
integer numaa,numab,numac,num3,i,j,k
character*4 fin
character*50 name,file

!
! ARCHIVOS USADOS
!

open(11,file='sol_1.ref.pdb')
rewind 11

open(12,file='Polcalcina.pdb')
rewind 12

!
! Lectura de Polcalcina
!

do i=1,1435
read(11,17)line2
write(12,17)line2
enddo

read(11,21)fin
write(12,21)'TER '

17 format(a77)
18 format(a72)
19 format(a72)
20 format(a13,a1,a7,a1,i4,a51,a1)
21 format(a4)

return
end
```

**Figura F.2:** Programa en lenguaje Fortran, separará la polcalcina del complejo.

```

PROGRAM CadenasSpike
IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
parameter(maxnat=1000000)
parameter(maxn=100000)
real*8 coorx,coory,coorz,coorxn,cooryn,coorz
real*8 boxx,boxy,boxz
character*72 lin1,lin2,lin3
character*79 line2
character*1 cad,cad2,cadn
integer numaa,numab,numac,num3,i,j,k
character*4 fin
character*50 name,file

!
! ARCHIVOS USADOS
do k=1,10
write(6,*)'Da el nombre del archivo a unir en soluciones'
read(5, '(A)') name
open(11,file=name)
rewind 11
open(12,file='sol_1-10.pdb')
rewind 12
!
!-----Ligando UNK-----
do j=1,185
read(11,20)lin1,simb,lin2,cad,numaa,lin3,simb2
write(12,20)lin1,simb,lin2,cad,numaa,lin3,simb2
enddo
!
!-----
enddo
17 format(a77)
18 format(a72)
19 format(a72)
20 format(a13,a1,a7,a1,i4,a51,a1)
21 format(a4)
return
end

```

Figura F.3: Programa en lenguaje Fortran, muestra los CDR de la Inmunoglobulina de las distintas soluciones.

```

IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
parameter(maxnat=1000000)
parameter(maxn=100000)
real*8 coorx,coory,coorz,coorxn,cooryn,coorz
real*8 boxx,boxy,boxz
character*72 lin1,lin2,lin3
character*79 line2
character*1 cad,cad2,cadn
integer numaa,numab,numac,num3,i,j,k
character*4 fin
character*50 name,file

!
! ARCHIVOS USADOS
write(6,*)'Da el nombre del archivo a transformar'
read(5, '(A)') name
open(11,file=name)
rewind 11
write(6,*)'Da el nombre del archivo de salida'
read(5, '(A)') file
open(12,file=file)
rewind 12
!
!-----
do i=1,3
c read(11,17)line2
c write(12,17)line2
c enddo
!-----Proteína-----
do j=1,1435
read(11,20)lin1,simb,lin2,cad,numaa,lin3,simb2
enddo
!-----Ligando Chain A-----
do i=1,654
c read(11,17)line2
c write(12,17)line2
c enddo
do j=1,87
read(11,20)lin1,simb,lin2,cad,numaa,lin3,simb2
write(12,20)lin1,simb,lin2,cad,numaa,lin3,simb2
enddo
!-----Ligando Chain B-----
do i=1,1626
c read(11,17)line2
c write(12,17)line2
c enddo
do j=1,96
read(11,20)lin1,simb,lin2,cad,numaa,lin3,simb2
write(12,20)lin1,simb,lin2,cad,numaa,lin3,simb2
enddo
!-----
c read(11,21)fin
write(12,21)'TER '
write(12,21)'END '
17 format(a77)
18 format(a72)
19 format(a72)
20 format(a13,a1,a7,a1,i4,a51,a1)
21 format(a4)
return
end

```

Figura F.4: Programa en lenguaje Fortran, selecciona al CDR de la Inmunoglobulina y de la polcalcina.



## 2. pH 7

### FireDock

**Tabla F.1:** Las 10 mejores posibles soluciones del Docking, las energías están dadas en kJ/mol.  
Datos obtenidos del servidor FireDock.

Rango	# Sol	Glob	avdW	rvdW	ACE	Inserción	aElec	laElec
1	56	-68.13	-32.40	11.89	-1.03	15.37	-48.63	-24.69
2	32	-63.79	-29.83	26.74	1.65	19.56	-75.37	-21.10
3	64	-58.27	-29.94	12.67	3.54	17.68	-31.59	-26.31
4	87	-55.15	-30.64	16.86	-3.25	19.17	-18.83	-25.95
5	52	-51.54	-28.58	24.62	3.86	16.50	-74.44	-5.40
6	21	-50.42	-39.38	38.95	-2.14	17.10	-11.12	-7.77
7	82	-49.66	-22.47	6.61	1.42	18.02	-18.72	-28.74
8	62	-48.53	-30.22	20.21	-6.61	15.60	-27.51	-3.07
9	48	-46.23	-23.06	14.29	0.21	16.56	-44.15	-16.14
10	77	-42.46	-28.11	20.53	0.14	16.51	0.00	-4.74

### Simulación

**Tabla F.2:** Estructura secundaria que conforma el complejo a pH 7.

	Sol 2			Sol 8		
	<i>Jun o 2</i>	IgE-Cad. C	IgE-Cad. D	<i>Jun o 2</i>	IgE-Cad.C	IgE-Cad. D
Hoja		4	4	1	4	4
Horquilla $\beta$		7	7	1	7	8
Strands		17	19	2	18	18
$\alpha$ -Hélice	9	2	2	9	3	1
Interac. hélices	7	1		11	1	
Giro- $\beta$	23	19	23	17	24	27
Giro- $\gamma$	2	4	3	1	4	2

## Distancia del calcio

### a) Distancia del calcio en la solución 2

**Tabla F.3:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 14. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
867	CG	ASP57	A	2815	CA195	A	2,68	2,42
868	OD1	ASP57	A	2815	CA195	A	2,33	
869	OD2	ASP57	A	2815	CA195	A	2,26	
889	CG	ASN59	A	2815	CA195	A	3,55	2,95
890	OD1	ASN59	A	2815	CA195	A	2,35	
910	CG	ASP61	A	2815	CA195	A	2,75	2,50
911	OD1	ASP61	A	2815	CA195	A	2,41	
912	OD2	ASP61	A	2815	CA195	A	2,33	
944	C	ARG63	A	2815	CA195	A	3,46	2,94
945	O	ARG63	A	2815	CA195	A	2,42	
1018	CG	GLU68	A	2815	CA195	A	3,87	2,81
1021	CD	GLU68	A	2815	CA195	A	2,66	
1022	OE1	GLU68	A	2815	CA195	A	2,38	
1023	OE2	GLU68	A	2815	CA195	A	2,31	

**Tabla F.4:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 6. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1388	CG	ASP95	A	2816	CA196	A	2,75	2,46
1389	OD1	ASP95	A	2816	CA196	A	2,3	
1390	OD2	ASP95	A	2816	CA196	A	2,34	
1407	CG	ASP57	A	2816	CA196	A	2,7	2,50
1408	OD1	ASP57	A	2816	CA196	A	2,3	
1409	OD2	ASP57	A	2816	CA196	A	2,51	

**Tabla F.5:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 5. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1926	CG	ASP133	A	2817	CA197	A	3,44	2,84
1928	OD2	ASP133	A	2817	CA197	A	2,24	
2026	CD	GLU142	A	2817	CA197	A	2,69	2,46
2027	OE1	GLU142	A	2817	CA197	A	2,33	
2028	OE2	GLU142	A	2817	CA197	A	2,35	

**Tabla F.6:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 12. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
2413	CG	ASP167	A	2818	CA198	A	3,38	2,78
2414	OD1	ASP167	A	2818	CA198	A	2,18	
2442	CG	ASN169	A	2818	CA198	A	3,55	2,95
2443	OD1	ASN169	A	2818	CA198	A	2,35	
2463	CG	ASP171	A	2818	CA198	A	3,40	3,17
2464	OD1	ASP171	A	2818	CA198	A	2,30	
2465	OD2	ASP171	A	2818	CA198	A	3,81	
2492	C	LEU173	A	2818	CA198	A	3,60	2,97
2493	O	LEU173	A	2818	CA198	A	2,34	
2566	CD	GLU178	A	2818	CA198	A	2,73	2,47
2567	OE1	GLU178	A	2818	CA198	A	2,26	
2568	OE2	GLU178	A	2818	CA198	A	2,41	



## b) Distancia del calcio en la solución 8

**Tabla F.7:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 8. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
867	CG	ASP57	A	2815	CA195	A	2,68	2,42
868	OD1	ASP57	A	2815	CA195	A	2,25	
869	OD2	ASP57	A	2815	CA195	A	2,29	
910	CG	ASP61	A	2815	CA195	A	2,72	2,46
911	OD1	ASP61	A	2815	CA195	A	2,48	
912	OD2	ASP61	A	2815	CA195	A	2,19	
944	C	ARG63	A	2815	CA195	A	3,53	2,94
945	O	ARG63	A	2815	CA195	A	2,34	

**Tabla F.8:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 6. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1388	CG	ASP95	A	2816	CA196	A	2,78	2,48
1389	OD1	ASP95	A	2816	CA196	A	2,38	
1390	OD2	ASP95	A	2816	CA196	A	2,28	
1407	CG	ASP57	A	2816	CA196	A	2,78	2,55
1408	OD1	ASP57	A	2816	CA196	A	2,51	
1409	OD2	ASP57	A	2816	CA196	A	2,36	

**Tabla F.9:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 6. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia.	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1926	CG	ASP133	A	2817	CA197	A	2,80	2,49
1927	OD1	ASP133	A	2817	CA197	A	2,35	
1928	OD2	ASP133	A	2817	CA197	A	2,31	
2026	CD	GLU142	A	2817	CA197	A	2,65	2,41
2027	OE1	GLU142	A	2817	CA197	A	2,30	
2028	OE2	GLU142	A	2817	CA197	A	2,29	

**Tabla F.10:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 12. Datos obtenidos de PDBSum.

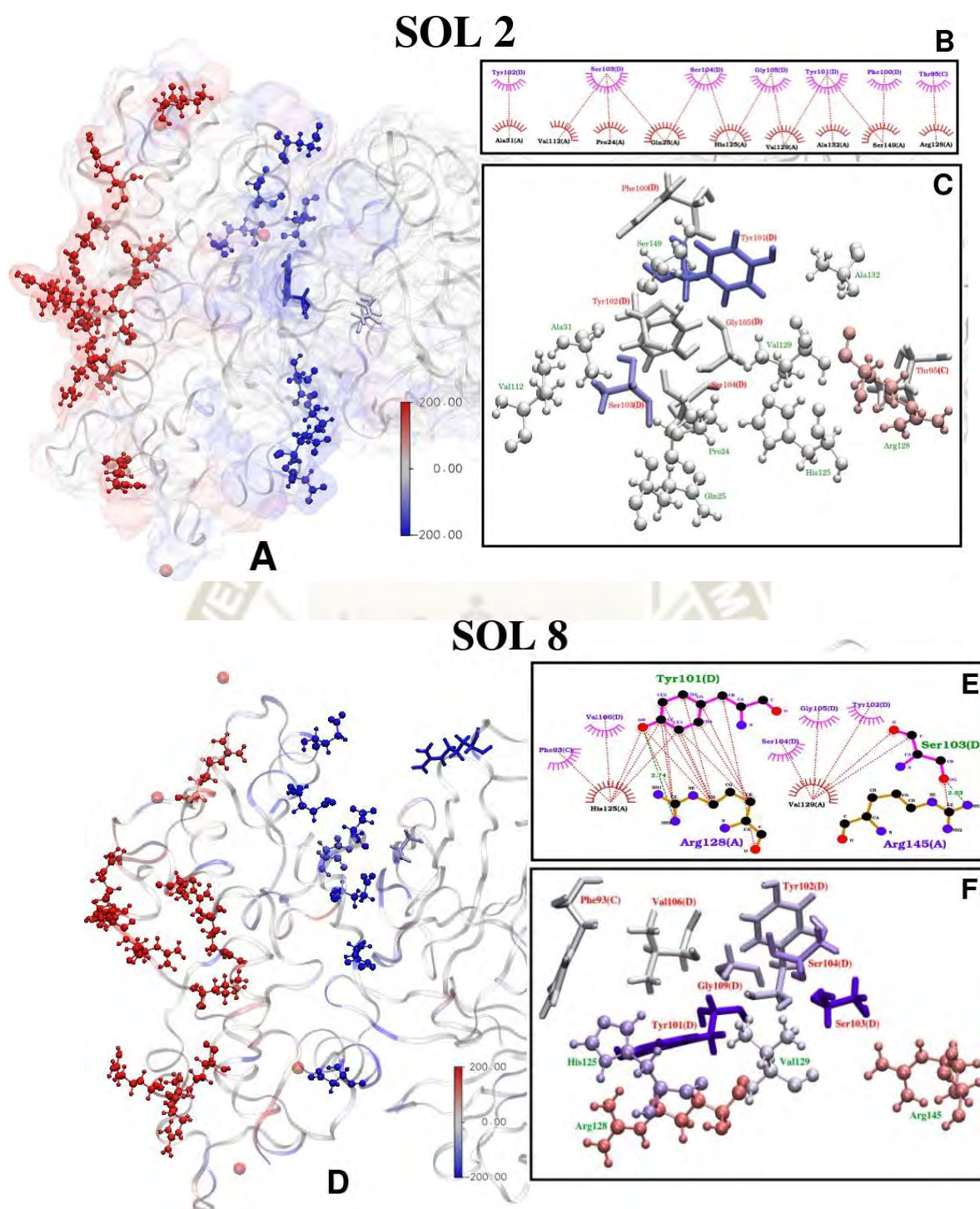
Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
2413	CG	ASP167	A	2818	CA198	A	3,40	2,82
2415	OD2	ASP167	A	2818	CA198	A	2,23	
2463	CG	ASP171	A	2818	CA198	A	3,70	
2464	OD1	ASP171	A	2818	CA198	A	2,37	2,79
2465	OD2	ASP171	A	2818	CA198	A	2,29	
2492	C	LEU173	A	2818	CA198	A	3,61	2,99
2493	O	LEU173	A	2818	CA198	A	2,37	
2566	CD	GLU178	A	2818	CA198	A	2,83	2,62
2567	OE1	GLU178	A	2818	CA198	A	2,69	
2568	OE2	GLU178	A	2818	CA198	A	2,34	

## Cálculo de la energía de interacción por MM-PBSA

**Tabla F.11:** Energía. Datos obtenidos de MMPBSA.

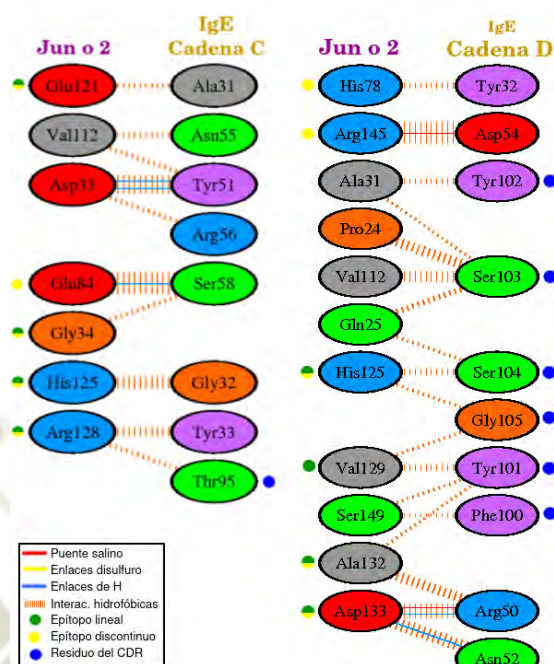
Solución	Interactuante		No Interactuante	
	Residuo	Energía	Residuo	Energía
2	Asp133	-395.17	Arg185	317.12
	Asp33	-316.94	Arg54	283.58
	Asn55(C)	-298.54	Arg161	259.32
	Glu84	-265.79	Arg13	253.29
	Asp35	-260.87	Arg15	222.33
	Asp83	-260.27	Arg63	215.93
	Asp131	-245.73	Lys192	207.14
	Glu121	-241.82	Arg51	206.07
	Tyr101(D)	-241.06	Arg14	199.79
	Glu142	-230.84	Lys18	196.88
8	Glu121	-359.44	Arg185	309.56
	Lys69(C)	-323.56	Arg161	302.59
	Glu91	-310.08	Arg13	290.17
	Asp35	-298.20	Arg54	261.47
	Glu41	-289.65	Arg51	259.29
	Asp33	-263.04	Arg15	248.22
	Glu84	-251.98	Arg14	226.16
	Arg17(C)	-251.78	Lys18	193.81
	Asp115	-248.98	Arg63	186.63
	Asp133	-235.65	Arg160	180.81



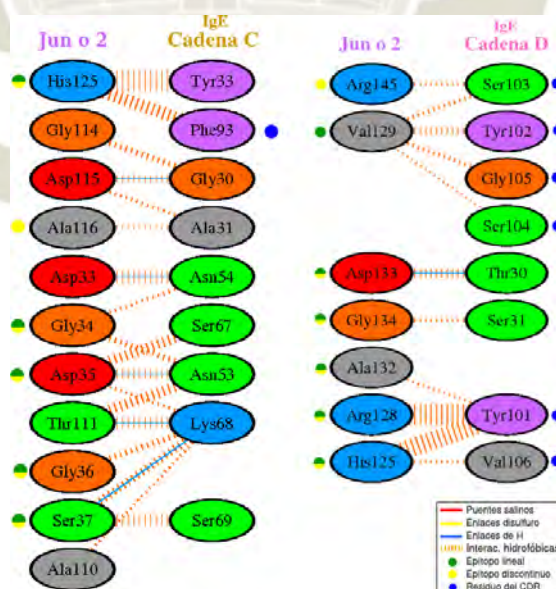


**Figura F.5:** Representación de los residuos que interaccionan en el complejo Polcalcina-IgE a pH 7. (A y D) Representación global polcalcina - IgE, las interacciones con energía favorable se muestran en color azul y las no favorable en color rojo. Las energías neutras o no interactuantes se muestran en color blanco. (B y E) Representación en 2D de las diferentes interacciones tanto hidrofóbicas (líneas punteadas rojas) como electrostáticas o enlaces de hidrógeno (líneas punteadas verdes). (C y F) Acercamiento de los residuos que interaccionan en el complejo polcalcina - IgE, el esquema de colores es el mismo que en A y D. Los residuos de la polcalcina están representados en estilo CPK y la IgE en licorice.





**Figura F.6:** Representación esquemática de los residuos interactuantes en el complejo polcalcina-IgE a pH 7 de la solución 2. El número de líneas de enlace entre dos residuos indica la cantidad de enlaces potenciales entre ellos. Para las interacciones hidrofóbicas, que pueden ser abundantes, el ancho de la línea rayada es proporcional a la fuerza de interacción. Coloración del residuo: Positivos (H,K,R); negativos (D,E); neutral (S,T,N,Q), alifático (A,V,L,I,M); aromático (F,Y,W), Pro y Gly (P,G); cisteína (C). Obtenido de PDBSum.



**Figura F.7:** Representación esquemática de los residuos interactuantes en el complejo polcalcina-IgE a pH 7 de la solución 8. El número de líneas de enlace entre dos residuos indica la cantidad de enlaces potenciales entre ellos. Para las interacciones hidrofóbicas, que pueden ser abundantes, el ancho de la línea rayada es proporcional a la fuerza de interacción. Coloración del residuo: Positivos (H,K,R); negativos (D,E); neutral (S,T,N,Q), alifático (A,V,L,I,M); aromático (F,Y,W), Pro y Gly (P,G); cisteína (C). Obtenido de PDBSum.

### 3. pH 6

#### FireDock

**Tabla F.11:** Las 10 mejores posibles soluciones del Docking, las energías están dadas en kJ/mol. Datos obtenidos del servidor FireDock.

Rango	# Sol	Glob	avdW	rvdW	ACE	Inserción	aElec	laElec
1	23	-55.89	-24.39	14.31	-1.93	14.99	-35.67	-8.25
2	31	-52.87	-41.33	29.57	4.93	17.97	-9.54	-25.68
3	7	-51.88	-17.06	7.75	-3.68	14.09	-33.15	-23.88
4	8	-45.94	-26.35	10.35	0.64	17.29	-22.42	-9.52
5	18	-45.92	-23.62	8.43	-6.47	13.01	0.00	-3.04
6	90	-43.47	-29.04	29.47	-8.82	15.80	-15.23	-5.18
7	91	-43.40	-26.61	5.48	7.99	20.06	-19.64	-27.20
8	21	-43.26	-31.09	26.91	-0.01	18.98	-30.38	-10.29
9	52	-40.59	-23.99	7.74	5.23	16.40	-24.56	-20.12
10	49	-39.87	-33.98	25.35	2.14	16.32	-29.90	-5.93

#### Simulación

**Tabla F.12:** Estructura secundaria que conforma el complejo a pH 6.

Sol 6				Sol 8		
	<i>Jun o 2</i>	IgE-Cad. C	IgE-Cad. D	<i>Jun o 2</i>	IgE-Cad.C	IgE-Cad. D
Hoja		4	4		4	4
Horquilla $\beta$		7	7		7	7
Strands		18	19		18	18
$\alpha$ -Hélice	11	3	2	9	3	4
Interac. hélices	9	1		8		
Giro- $\beta$	23	17	26	22	26	19
Giro- $\gamma$	3	2	3	4	2	2



## Distancia del calcio

### a) Distancia del calcio en la solución 6

**Tabla F.13:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 10. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
867	CG	ASP57	A	2817	CA195	A	2,65	2,42
868	OD1	ASP57	A	2817	CA195	A	2,3	
869	OD2	ASP57	A	2817	CA195	A	2,31	
889	CG	ASN59	A	2817	CA195	A	3,59	3,05
890	OD1	ASN59	A	2817	CA195	A	2,51	
910	CG	ASP61	A	2817	CA195	A	2,75	2,50
911	OD1	ASP61	A	2817	CA195	A	2,37	
912	OD	ASP61	A	2817	CA195	A	2,37	
944	C	ARG63	A	2817	CA195	A	3,63	3,03
945	O	ARG63	A	2817	CA195	A	2,42	

**Tabla F.14:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 6. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1389	CG	ASP95	A	2818	CA196	A	2,7	2,47
1390	OD1	ASP95	A	2818	CA196	A	2,23	
1391	OD2	ASP95	A	2818	CA196	A	2,42	
1408	CG	ASP97	A	2818	CA196	A	2,78	2,49
1409	OD1	ASP97	A	2818	CA196	A	2,43	
1410	OD2	ASP97	A	2818	CA196	A	2,26	

**Tabla F.15:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 3. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1928	CG	ASP133	A	2819	CA197	A	2,67	2,39
1929	OD1	ASP133	A	2819	CA197	A	2,25	
1930	OD2	ASP133	A	2819	CA197	A	2,26	



**Tabla F.16:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 13. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
2415	CG	ASP167	A	2820	CA198	A	2,59	2,40
2416	OD1	ASP167	A	2820	CA198	A	2,34	
2417	OD2	ASP167	A	2820	CA198	A	2,26	
2444	CG	ASN169	A	2820	CA198	A	3,67	3,14
2445	OD1	ASN169	A	2820	CA198	A	2,61	
2465	CG	ASP171	A	2820	CA198	A	3,31	3,04
2466	OD1	ASP171	A	2820	CA198	A	2,21	
2467	OD2	ASP171	A	2820	CA198	A	3,60	
2494	C	LEU173	A	2820	CA198	A	3,60	3,03
2495	O	LEU173	A	2820	CA198	A	2,46	
2568	CD	GLU178	A	2820	CA198	A	2,75	2,50
2569	OE1	GLU178	A	2820	CA198	A	2,32	
2570	OE2	GLU178	A	2820	CA198	A	2,44	

## b) Distancia del calcio en la solución 8

**Tabla F.17:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 10. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
867	CG	ASP57	A	2817	CA195	A	2,84	2,60
868	OD1	ASP57	A	2817	CA195	A	2,65	
869	OD2	ASP57	A	2817	CA195	A	2,32	
889	CG	ASN59	A	2817	CA195	A	3,65	3,07
890	OD1	ASN59	A	2817	CA195	A	2,48	
910	CG	ASP61	A	2817	CA195	A	2,64	2,39
911	OD1	ASP61	A	2817	CA195	A	2,18	
912	OD	ASP61	A	2817	CA195	A	2,36	
944	C	ARG63	A	2817	CA195	A	3,62	3,03
945	O	ARG63	A	2817	CA195	A	2,43	

**Tabla F.18:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 5. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1389	CG	ASP95	A	2818	CA196	9	2,07	2,39
1390	OD1	ASP95	A	2818	CA196	A	2,80	
1391	OD2	ASP95	A	2818	CA196	A	2,29	
1408	CG	ASP97	A	2818	CA196	A	3,35	2,78
1410	OD2	ASP97	A	2818	CA196	A	2,20	

**Tabla F.19:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 5. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1928	CG	ASP133	A	2819	CA197	A	2,76	2,50
1929	OD1	ASP133	A	2819	CA197	A	2,45	
1930	OD2	ASP133	A	2819	CA197	A	2,30	
1949	CG	SER135	A	2819	CA197	A	3,82	3,21
1950	O	SER135	A	2819	CA197	A	2,59	

**Tabla F.20:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 12. Datos obtenidos de PDBSum.

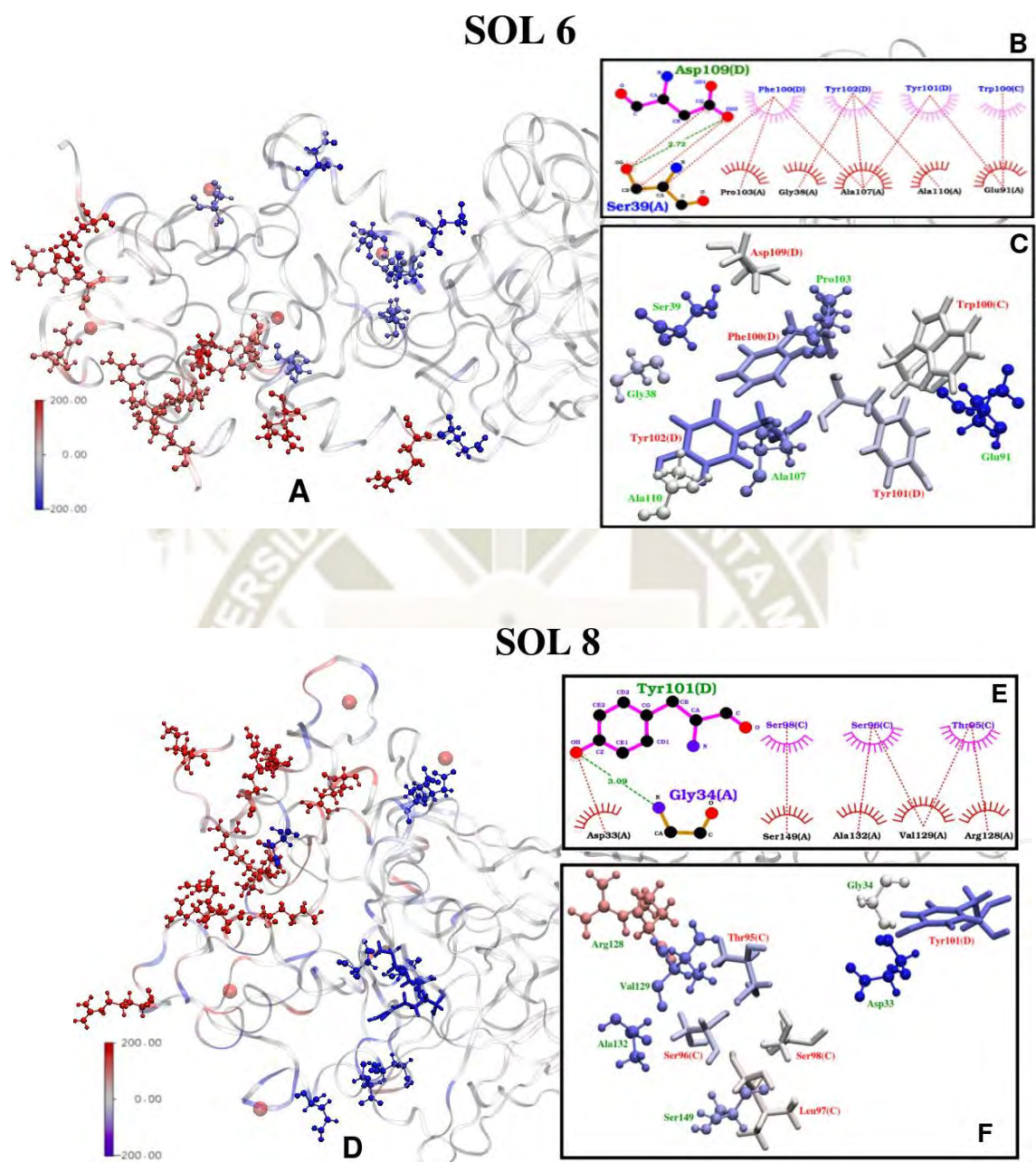
Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
2415	CG	ASP167	A	2820	CA198	A	3,56	2,93
2416	OD1	ASP167	A	2820	CA198	A	2,29	
2444	CG	ASN169	A	2820	CA198	A	3,35	2,79
2445	OD1	ASN169	A	2820	CA198	A	2,23	
2465	CG	ASP171	A	2820	CA198	A	3,33	3,11
2466	OD1	ASP171	A	2820	CA198	A	2,23	
2467	OD2	ASP171	A	2820	CA198	A	3,76	
2494	C	LEU173	A	2820	CA198	A	3,35	2,78
2495	O	LEU173	A	2820	CA198	A	2,21	
2568	CD	GLU178	A	2820	CA198	A	2,73	2,45
2569	OE1	GLU178	A	2820	CA198	A	2,40	
2570	OE2	GLU178	A	2820	CA198	A	2,21	

## Cálculo de la energía de interacción por MM-PBSA

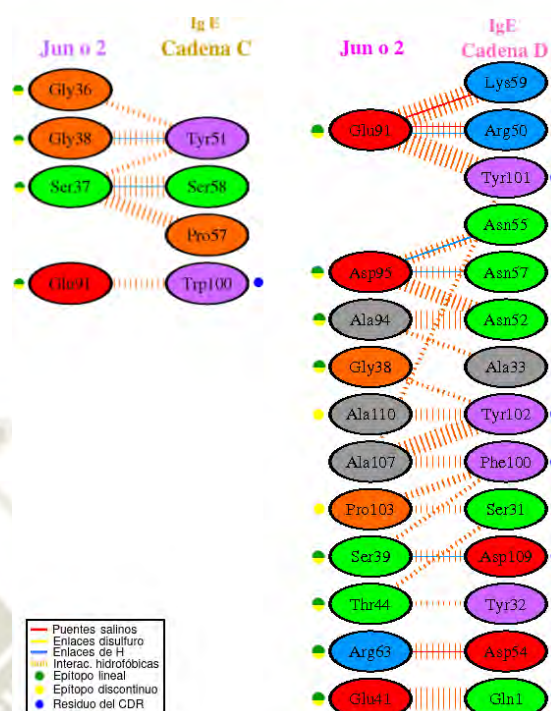
**Tabla F.21:** Datos de la energía interactuante y no interactuante de las soluciones. Datos obtenidos de MMPBSA.

Solución	Interactuante		No Interactuante	
	Residuo	Energía	Residuo	Energía
6	Glu91	-309.05	Arg51	314.99
	Asp95	-293.72	Arg192	232.83
	Asp61	-278.75	Arg185	232.63
	Asp83	-272.99	Arg42	229.25
	Asp97	-238.64	Arg160	222.77
	Glu41	-212.25	Arg15	216.15
	Glu104	-204.08	Lys180	207.90
	Asp122	-186.82	Arg5	204.32
	Asp93	-185.07	Asn169	198.77
	Asp133	-167.94	Arg124	196.35
8	Glu74	-336.91	Arg15	340.92
	Lys59(D)	-331.91	Arg51	329.94
	Glu84	-327.81	Arg54	321.42
	Asp33	-313.34	Lys192	294.75
	Glu91	-309.52	Arg42	286.12
	Asp83	-304.90	Arg185	283.34
	Glu142	-280.94	Arg161	276.39
	Arg50(D)	-279.74	Lys180	261.17
	Asp122	-270.67	Lys55	253.76
	Asp133	-262.77	Lys18	234.83

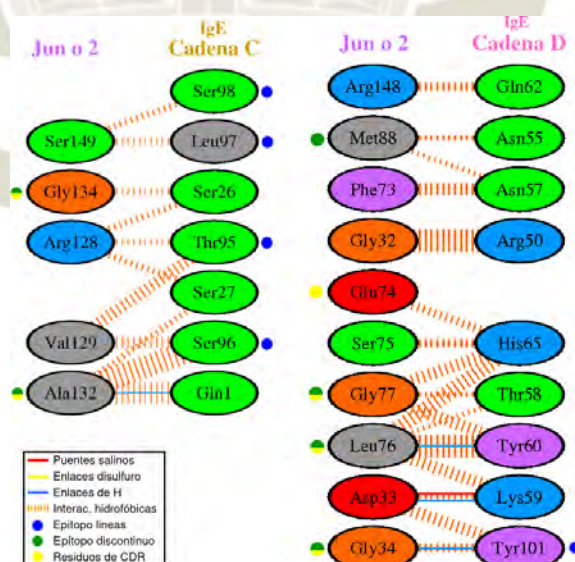




**Figura F.8:** Representación de los residuos que interaccionan en el complejo Polcalcina-IgE a pH 6. (A y D) Representación global polcalcina - IgE, las interacciones con energía favorable se muestran en color azul y las no favorable en color rojo. Las energías neutras o no interactuantes se muestran en color blanco. (B y E) Representación en 2D de las diferentes interacciones tanto hidrofóbicas (líneas punteadas rojas) como electrostáticas o enlaces de hidrógeno (líneas punteadas verdes). (C y F) Acercamiento de los residuos que interaccionan en el complejo polcalcina - IgE, el esquema de colores es el mismo que en A y D. Los residuos de la polcalcina están representados en estilo CPK y la IgE en licorice.



**Figura F.9 :** Representación esquemática de los residuos interactuantes en el complejo polcalcina-IgE a pH 6 de la solución 6. El número de líneas de enlaces entre dos residuos indica la cantidad de enlaces potenciales entre ellos. Para las interacciones hidrofóbicas, que pueden ser abundantes, el ancho de la línea rayada es proporcional a la fuerza de interacción. Coloración del residuo: Positivos (H,K,R); negativos (D,E); neutral (S,T,N,Q), alifático (A,V,L,I,M); aromático (F,Y,W), Pro y Gly (P,G); cisteína (C). Obtenido de PDBSum.



**Figura F.10:** Representación esquemática de los residuos interactuantes en el complejo polcalcina-IgE a pH 6 de la solución 8. El número de líneas de enlaces entre dos residuos indica la cantidad de enlaces potenciales entre ellos. Para las interacciones hidrofóbicas, que pueden ser abundantes, el ancho de la línea rayada es proporcional a la fuerza de interacción. Coloración del residuo: Positivos (H, K,R); negativos (D,E); neutral (S,T,N,Q), alifático (A,V,L,I,M); aromático (F,Y,W), Pro y Gly (P,G); cisteína (C). Obtenido de PDBSum.



## 4. pH 5

### FireDock

**Tabla F.21:** Las 10 mejores posibles soluciones del Docking, las energías están dadas en kJ/mol. Datos obtenidos del servidor FireDock.

Rango	# Sol	Glob	avdW	rvdW	ACE	Inserción	aElec	laElec
1	26	-46.30	-37.35	25.64	2.52	24.59	-8.19	-13.56
2	80	-44.37	-34.97	34.02	8.60	22,08	-51.01	-8.87
3	59	-41.95	-32.10	20.58	-5.03	15.41	-4.27	-2.67
4	45	-40.23	-27.16	17,03	-0.16	20.86	-21.61	0.00
5	48	-38.44	-22.11	12.57	3.62	14.56	-8.03	-14.81
6	77	-37.62	-30.14	17,03	5.86	16.83	-3.22	-9.78
7	11	-36.62	-35.86	33.16	8.89	17.19	-26.33	-12.88
8	8	-36.39	-26.01	24.20	-1.98	19.60	-22.69	-7.76
9	91	-32.30	-19.56	14.13	-0.09	16.14	-24.98	-11.47
10	37	-32.01	-24.60	22.36	7.46	17.29	-32.65	-19.34

### Simulación

**Tabla F.22:** Estructura secundaria que conforma el complejo a pH 5.

	Sol 2			Sol 5		
	Jun o 2	IgE-Cad. C	IgE-Cad. D	Jun o 2	IgE-Cad.C	IgE-Cad. D
Hoja		4	4		5	4
Horquilla $\beta$		7	7		7	7
Strands		18	18		18	19
$\alpha$ -Hélice	12	3	4	10	2	3
Interac. hélices	11	1		8	1	
Giro- $\beta$	21	24	16	26	21	23
Giro- $\gamma$	3	4	2	2	5	3

### Distancia del calcio

#### a) Distancia del calcio en la solución 2

**Tabla F.23:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 3. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
910	CD	ASP61	A	2818	CA195	A	2,74	
910	OD1	ASP61	A	2818	CA195	A	2,27	2,45
912	OD2	ASP61	A	2818	CA195	A	2,35	



**Tabla F.24:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 6. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1389	CG	ASP95	A	2819	CA196	A	2,74	2,48
1390	OD1	ASP95	A	2819	CA196	A	2,42	
1391	OD2	ASP95	A	2819	CA196	A	2,29	
1408	CG	ASP97	A	2819	CA196	A	2,63	2,39
1409	OD1	ASP97	A	2819	CA196	A	2,31	
1410	OD2	ASP97	A	2819	CA196	A	2,24	

**Tabla F.25:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 9. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1236	CD	GLU84	A	2820	CA197	A	2,72	2,47
1237	OE1	GLU84	A	2820	CA197	A	2,34	
1238	OE2	GLU84	A	2820	CA197	A	2,36	
1906	CG	ASP131	A	2820	CA197	A	2,81	2,52
1907	OD1	ASP131	A	2820	CA197	A	2,37	
1908	OD2	ASP131	A	2820	CA197	A	2,38	
1928	CG	ASP133	A	2820	CA197	A	2,74	2,49
1929	OD1	ASP133	A	2820	CA197	A	2,38	
1930	OD2	ASP133	A	2820	CA197	A	2,34	

**Tabla F.26:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 13. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
2416	CG	ASP167	A	2821	CA198	A	3,37	2,80
2417	OD1	ASP167	A	2821	CA198	A	2,22	
2445	CG	ASN169	A	2821	CA198	A	3,33	3,15
2446	OD1	ASN169	A	2821	CA198	A	2,26	
2447	ND2	ASN169	A	2821	CA198	A	3,85	
2466	CG	ASP171	A	2821	CA198	A	3,38	3,16
2467	OD1	ASP171	A	2821	CA198	A	2,31	
2468	OD2	ASP171	A	2821	CA198	A	3,78	
2495	C	LEU173	A	2821	CA198	A	3,77	3,16
2496	O	LEU173	A	2821	CA198	A	2,55	
2569	CD	GLU178	A	2821	CA198	A	2,81	2,55
2570	OE1	GLU178	A	2821	CA198	A	2,30	
2571	OE2	GLU178	A	2821	CA198	A	2,55	

## b) Distancia del calcio en la solución 5

**Tabla F.27:** Información sobre el Ca 195 que pertenece al bucle A en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 8. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
864	CB	ASP57	A	2818	CA195	A	3,57	2,97
867	CG	ASP57	A	2818	CA195	A	3,11	
869	OD2	ASP57	A	2818	CA195	A	2,22	
910	CD	ASP61	A	2818	CA195	A	3,47	2,89
912	OD2	ASP61	A	2818	CA195	A	2,30	
1021	CD	GLU68	A	2818	CA195	A	2,68	2,43
1022	OE1	GLU68	A	2818	CA195	A	2,27	
1023	OE2	GLU68	A	2818	CA195	A	2,33	

**Tabla F.28:** Información sobre el Ca 196 que pertenece al bucle B en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 6. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1389	CG	ASP95	A	2819	CA196	A	2,71	2,47
1390	OD1	ASP95	A	2819	CA196	A	2,34	
1391	OD2	ASP95	A	2819	CA196	A	2,35	
1408	CG	ASP97	A	2819	CA196	A	2,71	2,45
1409	OD1	ASP97	A	2819	CA196	A	2,23	
1410	OD2	ASP97	A	2819	CA196	A	2,42	

**Tabla F.29:** Información sobre el Ca 197 que pertenece al bucle C en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 7. Datos obtenidos de PDBSum.

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
1906	CG	ASP131	A	2820	CA197	A	2,72	2,45
1907	OD1	ASP131	A	2820	CA197	A	2,27	
1908	OD2	ASP131	A	2820	CA197	A	2,35	
1928	CG	ASP133	A	2820	CA197	A	3,42	2,83
1929	OD1	ASP133	A	2820	CA197	A	2,24	
1949	CG	SER135	A	2820	CA197	A	3,58	3,04
1950	O	SER135	A	2820	CA197	A	2,5	

**Tabla F.30:** Información sobre el Ca 198 que pertenece al bucle D en la polcalcina, el número de contactos no unidos es 13. Datos obtenidos de PDBSum

Átomo 1				Átomo 2			Distancia	Promedio
Nº A	A	Residuo	Cad.	Nº A	Residuo	Cad.		
2416	CG	ASP167	A	2821	CA198	A	2,74	2,48
2417	OD1	ASP167	A	2821	CA198	A	2,33	
2418	OD2	ASP167	A	2821	CA198	A	2,38	
2445	CG	ASN169	A	2821	CA198	A	3,58	3,00
2446	OD1	ASN169	A	2821	CA198	A	2,41	
2466	CG	ASP171	A	2821	CA198	A	3,25	3,46
2467	OD1	ASP171	A	2821	CA198	A	3,61	
2468	OD2	ASP171	A	2821	CA198	A	3,53	2,96
2495	C	LEU173	A	2821	CA198	A	3,53	
2496	O	LEU173	A	2821	CA198	A	2,39	
2569	CD	GLU178	A	2821	CA198	A	2,67	2,44
2570	OE1	GLU178	A	2821	CA198	A	2,32	
2571	OE2	GLU178	A	2821	CA198	A	2,33	

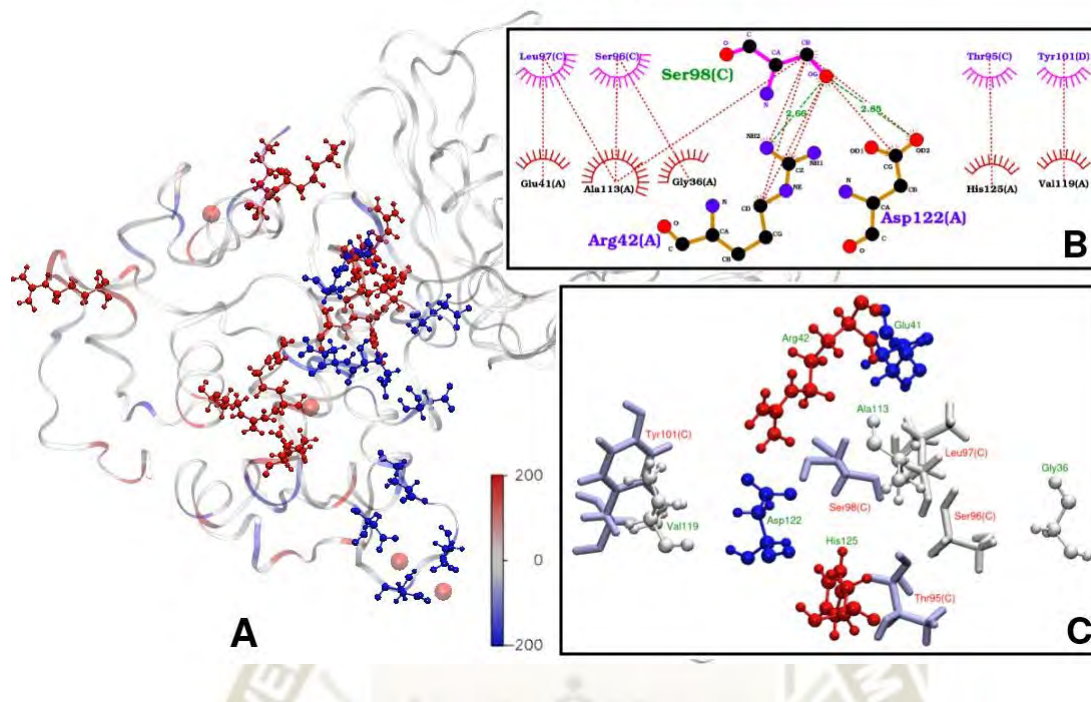
## Cálculo de la energía de interacción por MM-PBSA

**Tabla F.30:** Energía de interacción. Datos obtenidos de MMPBSA.

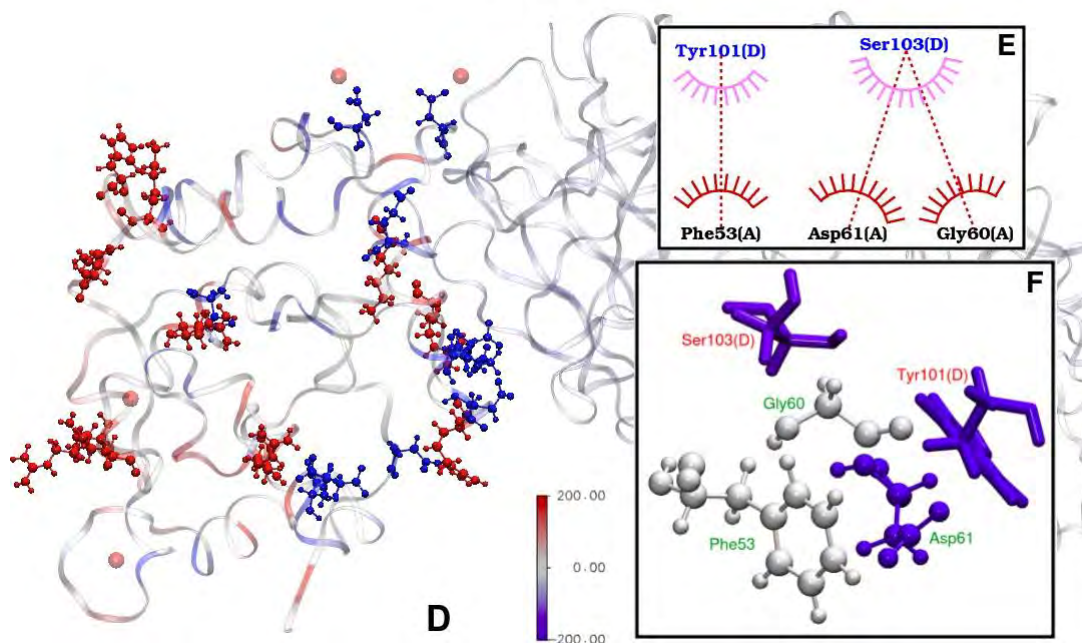
Solución	Interactuante		No Interactuante	
	Residuo	Energía	Residuo	Energía
2	Glu41	-451,83	Arg42	400,85
	Asp115	-403,77	Arg51	321,10
	Glu46	-393,02	Arg128	315,15
	Glu47	-371,09	His125	310,90
	Asp122	-353,01	Arg124	302,94
	Glu104	-334,61	Lys192	296,71
	Asp95	-334,50	Lys180	287,72
	Asp61	-322,60	Arg54	275,84
	Asp97	-319,35	Arg161	273,55
	Asp35	-305,19	Arg145	269,70
5	Glu47	-604,50	Arg161	359,40
	Glu46	-586,04	Arg160	352,84
	Asp95	-401,04	Lys55	349,47
	Glu41	-391,84	Arg5	336,15
	Glu104	-357,06	Lys3	304,42
	Asp122	-346,75	Arg124	300,52
	Asp115	-335,34	Arg42	296,41
	Glu152	-326,65	Arg51	295,46
	Asp61	-320,59	His78	294,24
	Glu121	-308,79	Arg145	294,10



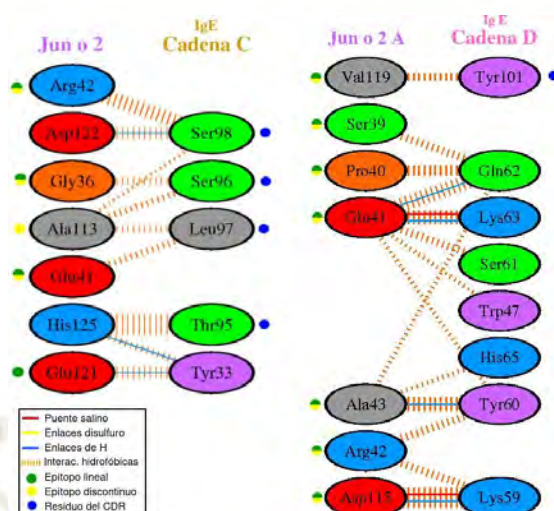
## SOL 2



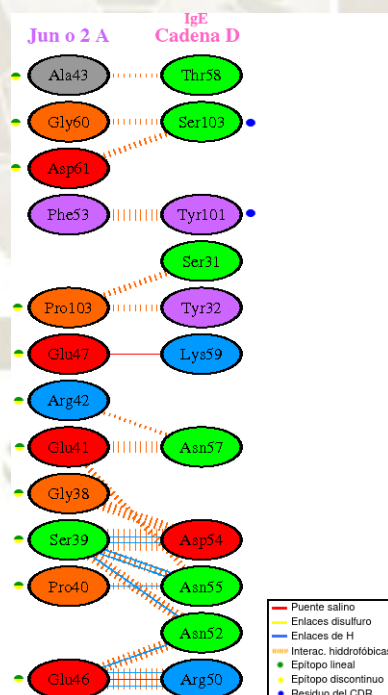
## SOL 5



**Figura F.11:** Representación de los residuos que interaccionan en el complejo Polcalcina-IgE a pH 6. (A y D) Representación global polcalcina - IgE, las interacciones con energía favorable se muestran en color azul y las no favorable en color rojo. Las energías neutras o no interactuantes se muestran en color blanco. (B y E) Representación en 2D de las diferentes interacciones tanto hidrofóbicas (líneas punteadas rojas) como electrostáticas o enlaces de hidrógeno (líneas punteadas verdes). (C y F) Acercamiento de los residuos que interaccionan en el complejo polcalcina - IgE, el esquema de colores es el mismo que en A y D. Los residuos de la polcalcina están representados en estilo CPK y la IgE en licorice.



**Figura F.12:** Representación esquemática de los residuos interactuantes en el complejo polcalcina-IgE a pH 5 de la solución 2. El número de líneas de enlaces entre dos residuos indica la cantidad de enlaces potenciales entre ellos. Para las interacciones hidrofóbicas, que pueden ser abundantes, el ancho de la línea rayada es proporcional a la fuerza de interacción. Coloración del residuo: Positivos (H,K,R); negativos (D,E); neutral (S,T,N,Q), alifático (A,V,L,I,M); aromático (F,Y,W), Pro y Gly (P,G); cisteina (C). Obtenido de PDBSum.



**Figura F.13:** Representación esquemática de los residuos interactuantes en el complejo polcalcina-IgE de la cadena D a pH 5 Solución 5. El número de líneas de enlaces entre dos residuos indica la cantidad de enlaces potenciales entre ellos. Para las interacciones hidrofóbicas, que pueden ser abundantes, el ancho de la línea rayada es proporcional a la fuerza de interacción. Coloración del residuo: Positivos (H,K,R); negativos (D,E); neutral (S,T,N,Q), alifático (A,V,L,I,M); aromático (F,Y,W), Pro y Gly (P,G); cisteina (C). Obtenido de PDBSum.