



FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOINFORMÁTICA

TESIS:

**DISEÑO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA SIMULAR
EL PROCESO DE ADSORCIÓN DEL ANTICUERPO
INMUNOGLOBULINA G1 SOBRE UNA SUPERFICIE SÓLIDA
DE CAOLINITA, UTILIZANDO TÉCNICAS DE DINÁMICA
MOLECULAR ATOMÍSTICAS**

Gabriel J. Olguín-Orellana

Profesor tutor: Dr. Nelson P. Barrera

Profesores cotutores: Dra. Ana Lilian Montero-Alejo; Felipe Montenegro

Profesor informante: Dr. Jans Alzate-Morales

Memoria para optar al título de Ingeniero en Bioinformática

Talca, Chile
12 de octubre de 2016



FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOINFORMÁTICA

TESIS:

**DISEÑO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA SIMULAR
EL PROCESO DE ADSORCIÓN DEL ANTICUERPO
INMUNOGLOBULINA G1 SOBRE UNA SUPERFICIE SÓLIDA
DE CAOLINITA, UTILIZANDO TÉCNICAS DE DINÁMICA
MOLECULAR ATOMÍSTICAS**

Gabriel J. Olguín-Orellana

Dr. Nelson P. Barrera : _____
Profesor tutor

Dra. Ana Lilian Montero-Alejo : _____
Profesora cotutora

Sr. Felipe Montenegro : _____
Profesor cotutor

Dr. Jans Alzate-Morales : _____
Profesor informante

Talca, Chile
12 de octubre de 2016

Agradecimientos

En primer lugar, a mis padres: Orieta Orellana y Juan Olgún. No podría ser de otra forma, pues son ellos quienes han hecho la parte más difícil en la dura tarea de entregarme educación. Gracias por la ayuda constante y por el amor infinito. Gracias por sentirse felices, aunque sea yo quien se lleve todo el crédito de este logro que también les pertenece.

A Emily Olgún, mi hermana; a Orieta Román, mi abuela; y a Amanda Bustamante, mi gran amiga. Cualquier camino es más fácil cuando se tiene la confianza de la familia, de la que nace y de la que se hace. Muchas gracias por todo el apoyo que me han dado ¡Las quiero!

Al Laboratorio de Biología Estructural y Nanofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, especialmente al profesor Nelson Barrera, quien me dio la oportunidad de formar parte de él. Me enorgullece pertenecer a un equipo de investigadores tan destacables.

A la Dra. Ana Montero, pues el desarrollo de este estudio no hubiera sido posible sin ella. Gracias, Ana, por darme tu amistad, la cual valoro enormemente, por transmitirme tu sabiduría y por enseñarme cual la forma correcta de hacer ciencia.

A los profesores Jans Alzate y Julio Caballero, por no haber escatimado tiempo para darme los mejores consejos sobre cómo arribar esta investigación a buen puerto. También por entregarme el entorno científico adecuado para desenvolverme y por concederme el honor de llevar el nombre del Centro de Bioinformática y Simulación Molecular a otros confines de nuestro continente.

A mis compañeros de generación: Evelin González, Cristóbal Hernández, Claudia Villegas, Karen Oróstica, Diego Díaz, Álvaro Ríos, Fabián González y Sandro Valenzuela, con quienes compartí las dichas y las tristezas de la vida académica, desde los primeros días universitarios. Gracias, amigos, por cada palabra de aliento, por cada esfuerzo que realizamos en conjunto y por esos carretes dignos de recordar hasta los últimos de nuestros días.

A la Fraternidad Juvenil $\alpha\pi\epsilon$ y en particular a los Centauros, pues en ellos encontré una fuente incesable de cariño, de compañerismo y de conocimiento. Gracias, hermanos, por mantener mi mente inquieta y mi alma confortada, y por haberme permitido vivir junto a ustedes muchos de los mejores momentos de mi vida ¡Que las virtudes sociales nos unan eternamente!

A Johanna Duglery, a Solange Besoain, a Yosseline Ortega y a Pablo Guerrero. No imaginan lo afortunado que me siento de haberlos encontrado. Gracias por darme ese lugar que no pertenece al espacio-tiempo, pero que existe donde están ustedes y que hoy llamo mi hogar.

A Verónica Carrasco, quien, a pesar de nuestras diferencias, siempre tuvo un oído atento, dispuesto a escuchar mis anhelos, mis fantasías, mis ambiciones y mis más íntimos sueños.

Y finalmente, a ti, que crees en mí al leer este documento ¡Que lo disfrutes!

Índice de contenidos

Índice de contenidos	5
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tablas.....	11
Resumen.....	12
Abstract	13
1. Marco teórico.....	14
1.1. Introducción.....	14
1.2. Importancia del estudio de la adsorción de proteínas	15
1.3. Factores que controlan la adsorción de proteínas	18
1.4. Estudios computacionales sobre la adsorción de proteínas	24
1.5. Propiedades de la caolinita como adsorbente	29
1.6. Propiedades la IgG1 como adsorbato.....	31
2. Hipótesis y objetivos.....	35
2.1. Hipótesis	35
2.2. Objetivo general.....	35
2.3. Objetivos específicos	35
3. Materiales y metodología	37
3.1. Hardware	38
3.2. Software.....	39
3.3. Selección del campo de fuerza	39
3.4. Creación y preparación de la superficie de caolinita para la DM.....	41
3.4.1. Obtención del modelo de la superficie de caolinita	41
3.4.2. Obtención del modelo de la superficie de caolinita en agua	42
3.5. Reconstrucción y preparación del modelo de la IgG1 para la DM	44
3.5.1. Obtención del modelo de la IgG1.....	44
3.5.2. Obtención del modelo de la IgG1 en agua.....	45
3.6. Preparación del modelo con la IgG1, la superficie de caolinita y el agua para la DM	47
3.7. Protocolo para las DMs.....	50
4. Presentación, análisis y discusión de los resultados.....	52

4.1. Construcción de la superficie de caolinita	52
4.1.1. Análisis de los archivos de coordenadas cartesianas .car.....	53
4.1.2. Análisis de los archivos de información molecular .mdf.....	55
4.1.3. Programación del script kaoliniteSurfGen.pl	57
4.2. Análisis de la estabilidad estructural de la superficie de caolinita en una caja de agua	58
4.3. Reconstrucción de los subdominios de la IgG1	63
4.4. Análisis de la estabilidad estructural de la IgG1 en una caja de agua	65
4.5. Determinación de la orientación inicial de la IgG1 sobre la superficie de caolinita.....	68
4.6. Análisis de la estabilidad estructural y de los sitios de interacción de la IgG1 con la superficie de caolinita	75
5. Conclusiones.....	84
6. Proyecciones futuras	86
7. Referencias	87
8. Anexos	93
8.1. Anexo 1: <i>Script</i> kaoliniteSurfGen.pl.....	93
8.2. Anexo 2: <i>Script</i> solvate.tcl.....	110
8.3. Anexo 3: <i>Script</i> replaceCoordinates.pl	111
8.4. Anexo 4: <i>Script</i> PSFProtein.tcl.....	115
8.5. Anexo 5: <i>Script</i> proteinInitialPosition.tcl	117
8.6. Anexo 6: <i>Script</i> restrainSurface.tcl	122
8.7. Anexo 7: Configuración para la DM de la superficie de caolinita en una caja de agua.....	123
8.8. Anexo 8: Configuración para la DM de la IgG1 en una caja de agua.....	126
8.9. Anexo 9: Configuración para la DM de la IgG1 y la superficie de caolinita en una caja de agua.....	129

Índice de Figuras

- Figura 1.** Representación esquemática del fenómeno de adsorción. Las propiedades (representadas por los diferentes colores) de las partículas determinan la cantidad y la forma en que interactúan con el adsorbente (verde). 14
- Figura 2.** Procesos de adsorción de proteínas en *carriers* poliméricos. (A) Dinámica de adsorción y desnaturalización de proteínas en una superficie desnuda; (B) Resistencia a la adsorción de la proteína sobre superficies con recubiertas poliméricas. Imagen modificada de (Wei et al. 2014). 18
- Figura 3.** Representación esquemática del proceso de adsorción de una proteína sobre una superficie sólida. (A) La proteína se acerca a la superficie y comienzan a experimentar interacciones no enlazantes. (B) El aumento en la entropía del sistema por la pérdida de las estructuras secundarias de la proteína y la desorción de los iones y del solvente favorecen el proceso de adsorción proteína-superficie. 21
- Figura 4.** Esquema de las interacciones de una proteína con una superficie con carga negativa. Las interacciones entre las proteínas y la superficie se inician con interacciones electrostáticas (A) y (B). Para proteínas duras la interacción es reversible, mientras que las proteínas blandas establecen otros contactos electrostáticos (C) que conducen la propagación de la proteína en la superficie (D) de forma cuasi irreversible. Imagen modificada de (Mathé et al. 2013). 22
- Figura 5.** Superficie de caolinita de 5x3x2 celdas unitarias. El rojo representa los átomos de oxígeno, el amarillo los de silicio, el rosa los de aluminio y el blanco los de hidrógeno. 31
- Figura 6.** Estructura de la IgG1. (A) Representación esquemática de la estructura de la IgG1. La cadena H está compuesta por una región variable (H_V) y tres regiones constantes (H_{C1} , H_{C2} y H_{C3}). La cadena L posee una región variable (L_V) y una región constante (L_C). La estabilidad de la molécula es otorgada por los puentes disulfuros (S-S) (Liu & May 2012) (B) Estructura tridimensional de la IgG1 (código PDB: 1HZH), obtenida mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 2,7 Å (Saphire et

al. 2001). En color verde y amarillo están representadas la cadenas pesadas, mientras que en púrpura y rojo las cadenas ligeras. 34

Figura 7. Superficie de caolinita en una caja de agua (archivos kaolinite_38x22_R.pdb y kaolinite_38x22_R_WB.pdb). 43

Figura 8. Diagrama de flujo que explica el proceso de creación y simulación de una superficie de caolinita en agua usando los *scripts* desarrollados para esta investigación y otros de terceros. Se han omitido los archivos de registro .log. 44

Figura 9. Proteína IgG1 b12 en una caja de agua (archivos 1HZH_M_RU_WB.pdb y 1HZH_M_RU_WB.psf). 46

Figura 10. Diagrama de flujo que explica el proceso de reconstrucción y simulación de la IgG1 b12 (PDB: 1hzh.pdb) en agua, usando los *scripts* desarrollados para esta investigación y otros de terceros. Se han omitido los archivos .log. 47

Figura 11. Superficie de caolinita y proteína IgG1 b12 en una caja de agua (archivos 1HZH_kaolinite_WB.pdb y 1HZH_kaolinite_WB.psf). Los nombres Fab1 y Fab2 fueron elegidos arbitrariamente para mayor comprensión del análisis posterior. 49

Figura 12. Diagrama de flujo que explica el proceso de creación y simulación de sistema compuesto por una superficie de caolinita, una IgG1 b12 y agua, usando los *scripts* desarrollados para esta investigación y otros de terceros. Se han omitido los archivos .log. 50

Figura 13. Estructura de la caolinita. (A) Estructura tridimensional de la celda unitaria de caolinita (Bish 1993) (archivos kaolinite_unit_cell.car y kaolinite_unit_cell.mdf) (B) Estructura tridimensional de la lámina simple de caolinita de 5x3x1 celdas unitarias (archivos kaolinite15_single_layer.car y kaolinite15_single_layer.mdf). El color de los átomos sigue la representación señalada en la Figura 5. 53

Figura 14. Representación esquemática del archivo kaolinite15_single_layer.car... 55

Figura 15. Temperatura del sistema conformado por la superficie en una caja de agua durante 11,1 ns de DM. El valor promedio fue de 297,6±0,9 K. 59

Figura 16. Presión del sistema conformado por la superficie en una caja de agua durante 11,1 ns de DM. El valor promedio fue de 1,1±8,1 atm. 60

Figura 17. Raíz cuadrada del desplazamiento cuadrático medio (RMSD) de los átomos de la superficie de caolinita, calculada a partir de la trayectoria de la DM. Se utilizó como referencia la estructura de partida de la simulación.	61
Figura 18. Función de distribución radial de pares entre los hidrógenos expuestos al medio de la capa basal de aluminio y de los oxígenos expuestos al medio de la capa basal de silicio de la caolinita con el agua.....	62
Figura 19. Representación de la estructura cristalográfica de la IgG1 b12 humana intacta (código PDB: 1HZH). El <i>zoom</i> corresponde a las regiones en las que existen <i>gaps</i> estructurales en la cadena pesada K (color verde): siete residuos en la región bisagra, entre la SER127 y la THR137; tres residuos en un <i>loop</i> uno de los dominios Fab, entre la CYS235 y la CYS239; y tres residuos que van desde la SER475 hasta el extremo C-terminal de la cadena. Los colores de las cadenas siguen lo señalado en la Figura 6, mientras que el azul muestra los residuos anterior y posterior a cada <i>gap</i>	63
Figura 20. Representaciones tridimensionales comparadas de la estructura de la proteína 1HZH (transparente) y su modelo por homología de menor molpdf, al que se denominó 1HZH_M (opaco). Los colores de las cadenas siguen lo señalado en la Figura 6, mientras que el azul muestra los residuos anterior y posterior a cada <i>gap</i> en el modelo 1HZH y los residuos reconstruidos en el modelo 1HZH_M.	65
Figura 21. Temperatura del sistema conformado por la IgG1 en una caja de agua durante 25,4 ns de DM. El valor promedio fue de $298,7 \pm 0,5$ K.	66
Figura 22. Presión promedio del sistema conformado por la IgG1 en una caja de agua durante 25,4 ns de DM. El valor promedio fue de $1,0 \pm 2,9$ atm.	66
Figura 23. RMSD de los átomos de la proteína, calculada a partir de la trayectoria de la DM. Se utilizó como referencia la estructura de partida de la simulación.....	68
Figura 24. Estructura de la IgG1 en su orientación rotacional más favorable para la adsorción sobre la superficie de caolinita. Los colores de las cadenas siguen la representación señalada en la Figura 6. Las esferas cian representan los átomos de nitrógeno y de oxígeno de los residuos considerados favorables y las esferas naranjas los $C\alpha$ de los residuos considerados desfavorables. La línea punteada señala la posición que ocuparía posteriormente la superficie.	74

Figura 25. Temperatura del sistema conformado por la IgG1 y la superficie de caolinita en una caja de agua durante 11,446 ns de DM. El valor promedio fue de $298,7 \pm 0,4$ K.	75
Figura 26. Presión promedio del sistema conformado por la proteína y la superficie en una caja de agua durante 11,446 ns de DM. El valor promedio fue de $1,0 \pm 3,1$ atm.	76
Figura 27. RMSD comparado de los átomos de la proteína en agua, en presencia y ausencia de la superficie de caolinita.	78
Figura 28. Histograma de frecuencia de las distancias entre el hidrógeno de la capa basal de aluminio de la superficie (donor del enlace de hidrógeno) y oxígeno o nitrógeno (aceptor del enlace de hidrógeno) de los residuos más cercanos a la superficie del dominio Fc. El cuadro gris representa las distancias entre las cuales se pueden formar enlaces de hidrógeno.	79
Figura 29. Histograma de frecuencia de las distancias entre el hidrógeno de la capa basal de aluminio de la superficie (donor del enlace de hidrógeno) y oxígeno o nitrógeno (aceptor del enlace de hidrógeno) de los residuos más cercanos a la superficie del dominio Fab2. El cuadro gris representa las distancias entre las cuales se pueden formar enlaces de hidrógeno.	80
Figura 30. Representación tridimensional del desplazamiento de los residuos de la IgG1 que formaron enlaces de hidrógeno con la superficie de caolinita. Las abreviaciones (PI) y (PE) significan posición de inicio y posición de enlace, respectivamente.	81
Figura 31. Energías de las interacciones no enlazantes del sistema conformado por la IgG1 y la superficie de caolinita en una caja de agua.	83

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de las orientaciones rotacionales de máxima afinidad para la IgG1 (archivo: 1HZH_M_RU_MD.pdb) al actuar como adsorbato sobre la capa basal de aluminio de la caolinita. Estas fueron halladas con el <i>script</i> <code>proteinInitialPosition.tcl</code> cuando el ángulo de exploración fue de 15°, el <i>cut-off</i> fue de 12 Å y la distancia proteína-superficie fue de 2 Å.	71
Tabla 2. Lista de los átomos que favorecen y que desfavorecen la interacción con la capa basal de aluminio de la caolinita, para los ángulos $\alpha_x=255^\circ$, $\alpha_y=360^\circ$ y $\alpha_z=15^\circ$	73

Resumen

La adsorción es un fenómeno fisicoquímico de interface en el cual las partículas (átomos, iones, moléculas, etc.) se adhieren e interactúan con una superficie pudiendo experimentar cambios estructurales, químicos y funcionales. En el caso de las proteínas, el cambio afecta su configuración espacial a nivel de estructura secundaria y terciaria. Esto ocurre en mayor o menor medida según la estabilidad interna que ésta posea, haciendo de la adsorción un proceso reversible cuando la estabilidad es alta o irreversible cuando es baja. La adsorción de proteínas es un fenómeno clave en diversos procesos biológicos y biotecnológicos. Aunque los factores fisicoquímicos involucrados en el proceso no están totalmente claros, se tiene conocimiento de que tanto la cantidad adsorbida como la susceptibilidad a este fenómeno se ve afectada por 1) las propiedades de las proteínas como la carga, el tamaño, la estabilidad de la estructura y la composición aminoacídica; 2) las propiedades de la superficie como la polaridad, la hidrofobicidad y la morfología; y 3) las condiciones ambientales como la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la composición del tampón.

En este proyecto se diseñó una nueva metodología que permitió estudiar las primeras etapas del proceso de adsorción del anticuerpo IgG1 sobre una superficie sólida de caolinita, usando técnicas de dinámica molecular atómica. Esta metodología significa un aporte importante al estudio del comportamiento interfacial de las proteínas y podrá ser extendido a otros sistemas proteicos más complejos.

Abstract

Adsorption is a physicochemical interface phenomenon in which particles (atoms, ions, molecules, etc.) interact when they stick onto a surface, which could trigger structural, chemical and functional changes. In case of proteins, the structural change affects their spatial configuration in their secondary and tertiary structure. This happens in greater or lesser degree according to the internal stability of the protein, making adsorption a reversible process when its stability is high or irreversible when it is low. The protein adsorption is a key phenomenon in several biological and biotechnological processes. Although the physicochemical factors involved in the process are not totally clear, it is known that the adsorbed quantity as well as the susceptibility to this phenomenon is influenced by 1) the protein properties as charge, size, structural stability and amino acidic composition; 2) the surface properties as polarity, hydrophobicity and morphology; and 3) the environmental conditions as temperature, pH, ionic strength and buffer composition.

In this project, a novel methodology to study the adsorption process of the IgG1 antibody on a solid surface of kaolinite, using atomistic molecular dynamics techniques was designed. This novel methodology represents an important contribution to the study of interfacial behavior of proteins and can be extended to other protein systems more complex.

1. Marco teórico

1.1. Introducción

La adsorción es un fenómeno de interface en el cual pueden participar diferentes tipos de partículas, pudiendo ir desde algunas muy pequeñas como las de agua, hasta otras de mayor tamaño y complejidad como proteínas o lípidos (Figura 1) (Nollert et al. 1995; Ortega-Vinuesa et al. 1995).

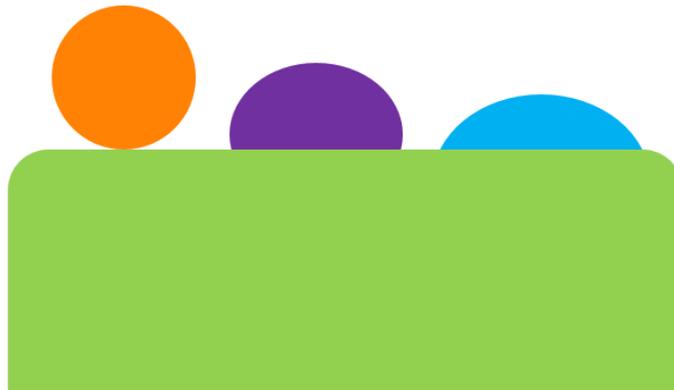


Figura 1. Representación esquemática del fenómeno de adsorción. Las propiedades (representadas por los diferentes colores) de las partículas determinan la cantidad y la forma en que interactúan con el adsorbente (verde).

La adsorción de proteínas se ha descrito como un fenómeno frecuente pero complicado, que acapara interés científico por la incidencia que tiene en distintas áreas como la medicina y biomedicina, farmacología, biotecnología, toxicología, procesamiento de alimentos, bioingeniería, entre muchas otras (Norde 1996; Gray 2004). Las proteínas son macromoléculas orgánicas, cuyos monómeros son los aminoácidos. Se caracterizan por desarrollar diferentes funciones en el organismo entre las que destacan la estructural y de señalización, la comunicación celular, la enzimática, la inmunológica y de transporte. Investigaciones recientes señalan que si

una proteína entra en contacto con una superficie sólida lo más probable es que se adsorba sobre ella; sin embargo, tanto la cantidad, densidad, conformación y orientación de las proteínas que se adsorben varía de acuerdo al tipo de proteína, el tipo de superficie y la composición del solvente. Como consecuencia, la adhesión de las proteínas a una superficie puede ir acompañada de la pérdida de su estructura (Wei et al. 2014) y por consiguiente, de la función que desempeña de forma reversible o irreversible (Mathé et al. 2013).

1.2. Importancia del estudio de la adsorción de proteínas

El proceso de adsorción de proteínas está presente en muchos procesos biológicos. En el área de la fisiología se ha observado que tiene un rol crucial en los primeros pasos de la señalización celular y en la cascada de coagulación de la sangre (Rabe et al. 2011), así como en la integración de proteínas periféricas en la bicapa lipídica (Aisenbrey et al. 2008). En el cultivo de células dependientes de anclaje, parece probable que la adhesión de células en presencia de suero se rija por una competencia entre la adsorción de las proteínas de la matriz extracelular, las proteínas secretadas por las células y las proteínas que ya están presentes en el suero. Por ejemplo, cuando la adsorción de las proteínas del suero ocurre antes que las de la matriz extracelular, la adhesión celular se ve retrasada o inhibida (Nakanishi et al. 2001). La adsorción cumple un rol importante en otros procesos como la formación de la placa dental y la adherencia de microorganismos en un medio acuoso (Nakanishi et al. 2001). También se han observado efectos adversos donde se ve involucrada la adsorción. Cambios en la estructura proteica después de la adsorción sobre superficies internas o exógenas de un organismo pueden conducirlo a la pérdida de tolerancia inmunológica, lo que podría ocasionar una respuesta inmune sobre la proteína desnaturalada (Nel et al. 2009).

En el área de los biomateriales, se ha descrito la adsorción de proteínas no específicas del suero sanguíneo que entran en contacto con implantes biomédicos. Estudios revelan que la composición de la capa adsorbida sobre el implante determina si la respuesta del organismo será favorable o adversa, de acuerdo a la cascada de reacciones biológicas que produzca. Por esta razón, tener conocimiento de los factores involucrados en el proceso de adsorción permitirá prevenir la formación de coágulos que podrían ocasionar una trombosis (Wei et al. 2014; Malmsten et al. 1997). En tejidos artificiales, además, las proteínas de andamiaje son el factor clave para la adecuada vascularización y adhesión de partículas, bacterias o células que promueven la cascada fisiológica que define la inflamación de los tejidos circundantes (Rabe et al. 2011). Por otro lado, se ha visto que las proteínas y los péptidos presentes en el suelo cumplen un papel importante en la movilidad y transporte de agroquímicos y pesticidas. Por esta razón, la interacción entre proteínas y superficies de arcilla en suelos fértiles podría ser, en gran medida, una solución para la purificación de aguas subterráneas, así como para la remediación del suelo cuando existe presencia de proteínas tóxicas (Yu 2000).

El fenómeno de adsorción también cobra importancia en el desarrollo de técnicas experimentales. En la preparación de enzimas inmovilizadas por adsorción, la actividad enzimática está fuertemente influenciada por la cantidad y la orientación de las enzimas que se adsorben, lo cual afecta su estabilidad y actividad (Nakanishi et al. 2001). Otro caso donde se observa la interacción enzima-superficie es en inmunoensayos ligados a enzimas, los cuales son utilizados a menudo para medir trazas de proteínas por las interacciones antígeno-anticuerpo. En ellos, la posición del epítipo y de los fragmentos de unión al antígeno determinan si habrá un reconocimiento correcto entre ambas moléculas, lo que indica que la orientación de la adsorción podría afectar la sensibilidad analítica de esta técnica (Nakanishi et al. 2001; Thermo Scientific 2010).

Para la bioingeniería, el proceso de adsorción también es relevante. Haciendo uso de biosensores es posible monitorear el cultivo celular o el nivel de glucosa en la

sangre *in situ*. Además, se tiene conocimiento de que su especificidad y durabilidad depende de la adsorción de proteínas sobre su superficie (Nakanishi et al. 2001). Es más, la adsorción de proteínas no específicas sobre ellos es un problema, pues afecta el rendimiento analítico del dispositivo (Rabe et al. 2011).

Por último, la adsorción se ha convertido en uno de los focos relevantes de la farmacología (de Castro et al. 2014; Norde 1996) y nanotoxicología moderna (Wei et al. 2014). A la fecha, se sabe que el transporte apropiado de fármacos por *carriers* poliméricos está íntimamente ligado con la adsorción, ya que la superficie de la mayoría de ellos es cubierta con una capa de proteínas al ser inyectadas en la sangre. Esta capa, denominada “corona”, es la que determina la respuesta del organismo frente a los *carriers*. Por esta razón, para entender los factores y efectos que produce, es necesario tener conocimiento de su composición y evolución temporal (Wei et al. 2014). Además, la adsorción de proteínas sobre el transportador viene acompañada por una lenta desnaturalización (Figura 2A), lo que se traduce en un reconocimiento inmunológico de las nanopartículas (Wei et al. 2014). Diversas investigaciones tienen como propósito inhibir la formación de la corona a partir de proteínas no específicas o utilizando recubrimientos poliméricos (Figura 2B), para permitir una larga circulación del *carrier* por el torrente sanguíneo y aumentar su capacidad de orientación (Nakanishi et al. 2001; de Castro et al. 2014).

El estudio del fenómeno de adsorción para conocer los mecanismos moleculares que lo controlan permitirá en el futuro desarrollar técnicas para intervenir en los procesos biológicos relevantes mediante una adsorción controlada, con el propósito de prevenir aquellos efectos desfavorables para el organismo. Su comprensión también será útil en la utilización de biomateriales con mayor especificidad, que tengan la capacidad de cumplir con las necesidades que se requieran según su aplicación específica; servirá en el desarrollo de nuevas técnicas experimentales que permitan evaluar con mayor detalle algún acontecimiento biológico *in vitro*; facilitará el desarrollo de nuevos biosensores con un mayor nivel

de precisión; y mejorará el transporte de fármacos mediante el desarrollo de nuevos *nanocarriers* con mayor especificidad, entre muchas otras aplicaciones.

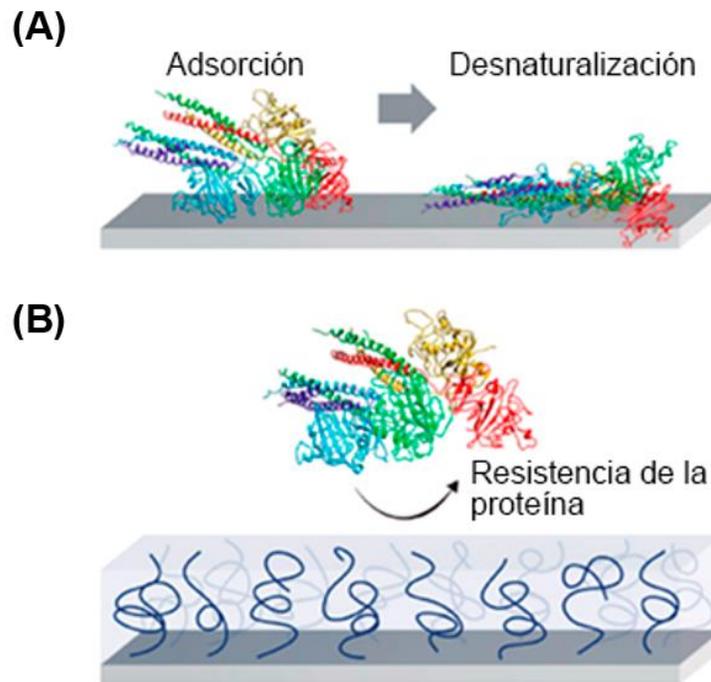


Figura 2. Procesos de adsorción de proteínas en *carriers* poliméricos. (A) Dinámica de adsorción y desnaturalización de proteínas en una superficie desnuda; (B) Resistencia a la adsorción de la proteína sobre superficies con recubiertas poliméricas. Imagen modificada de (Wei et al. 2014).

1.3. Factores que controlan la adsorción de proteínas

El proceso de adsorción de proteínas es extremadamente complejo, tanto que los mecanismos y estructuras determinantes de la interacción proteína-superficie aún no han sido totalmente descritos (Norde 2008). No obstante, se conoce que la

cantidad adsorbida y la susceptibilidad a la adsorción se modifica por las propiedades de la proteína como la carga, el tamaño, la estabilidad de la estructura, la composición aminoacídica y la orientación espacial; las propiedades de la superficie sólida como la polaridad, la hidrofobicidad y la morfología; y las condiciones ambientales como la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la composición del tampón (Rabe et al. 2011; Nakanishi et al. 2001).

Para lograr entender el proceso de adsorción de proteínas sobre superficies sólidas, es fundamental dar respuestas a interrogantes como:

- ♦ ¿Por qué y cómo se adsorben las proteínas?
- ♦ ¿Qué reglas mecánicas guían el fenómeno de adsorción?
- ♦ ¿Por qué algunas proteínas se adsorben y otras no?
- ♦ ¿Es la adsorción un proceso reversible?
- ♦ ¿Qué factores determinan la reversibilidad?
- ♦ ¿Influye la adsorción en la función biológica de la proteína?

Una descripción cruda podría asumir que los determinantes básicos de la adsorción de proteínas son las interacciones electrostáticas en superficies cargadas y las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Esta explicación es perfectamente funcional para técnicas cromatográficas, pero falla al explicar la adsorción no específica que ocurre, por ejemplo, en biosensores o implantes (Mathé et al. 2013). Es por esta razón que se requiere una explicación más detallada de otros factores que tienen implicancia en el proceso.

En el comienzo del proceso de adsorción, las proteínas se aproximan a la superficie en su estado nativo, asociándose a ella a través de algunos sitios de contacto iniciales. Posteriormente, ocurre una reorganización estructural impulsada por las interacciones favorables proteína-superficie y por un aumento en la entropía, debido a la pérdida de la estructura secundaria de la macromolécula y por la desorción de los iones y del solvente (Rabe et al. 2011) (Figura 3). Muchas proteínas

se unen débilmente a la superficie y sólo aumentan su afinidad después de un tiempo, debido a los cambios estructurales que van experimentando. La adsorción puede conducir a una alteración estructural irreversible de la proteína, impidiendo que vuelva a plegarse hacia su estructura nativa después de la desorción. Por esta razón, las proteínas desorbidas tienden a adsorberse más en una superficie que las proteínas en estado nativo (Nakanishi et al. 2001).

La orientación inicial de la proteína determina en gran medida qué parte de la molécula interactúa con la superficie. Debido a sus estructuras complejas, las proteínas exhiben diferentes afinidades de acuerdo a la composición aminoacídica local, lo que explica como una proteína de carga neta positiva o negativa puede adsorberse en una superficie de carga neta similar (Rabe et al. 2011). Este factor cobra importancia cuando la proteína es bioactiva, como son los receptores, anticuerpos o enzimas, pues una alteración estructural en las regiones de actividad afectará su eficiencia, pudiendo llegar al punto de quedar completamente inactivas.

La estabilidad de una proteína, dada por propiedades como el tamaño, la carga y la composición, es de particular importancia para analizar su comportamiento interfacial (Rabe et al. 2011). Aquellas proteínas rígidas, con una alta estabilidad interna, se denominan proteínas “duras” (*“hard” proteins*) y se caracterizan por ser poco susceptibles a alteraciones estructurales. Algunas proteínas duras son la α -quimiotripsina, la ribonucleasa y la lisozima. Por otro lado, las proteínas con cohesión interna baja como la hemoglobina, la albumina de suero humano (HSA) y la β -caseína son llamadas proteínas “blandas” (*“soft” proteins*), pues tienden a deformarse al entrar en contacto con una superficie (Nakanishi et al. 2001; Mathé et al. 2013; Norde 1996; Rabe et al. 2011). En consecuencia, para ambos tipos de proteínas el estado conformacional luego de la adsorción es, en mayor o menor medida, diferente al nativo.

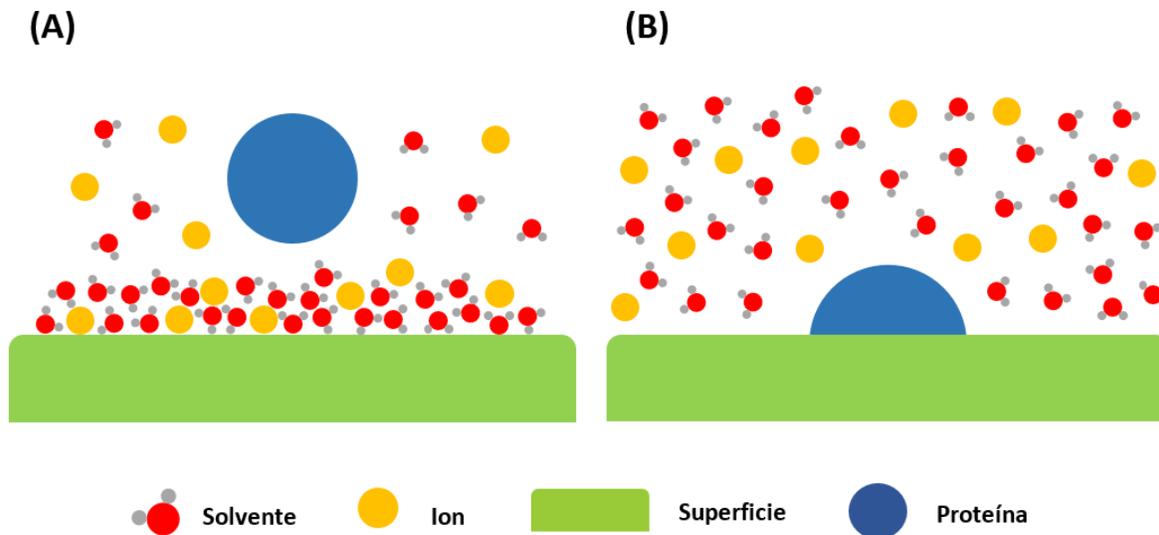


Figura 3. Representación esquemática del proceso de adsorción de una proteína sobre una superficie sólida. (A) La proteína se acerca a la superficie y comienzan a experimentar interacciones no enlazantes. (B) El aumento en la entropía del sistema por la pérdida de las estructuras secundarias de la proteína y la desorción de los iones y del solvente favorecen el proceso de adsorción proteína-superficie.

Para las proteínas duras, las cantidades adsorbidas sobre superficies hidrofílicas son generalmente muy pequeñas a menos que exista una interacción electrostática, mientras que su adsorción es favorable en superficies hidrofóbicas produciendo cambios en su estructura. (Figura 4A).

Por otro lado, las proteínas blandas, que suelen ser de mayor tamaño (Norde & Giacomelli 2000), tienden a adsorberse sobre cualquier superficie, como resultado de un aumento en la entropía conformacional resultante de la adsorción; es decir, se adsorben sobre superficies aunque exista repulsión electrostática. Tras el contacto (Figura 4B y 4C), estas proteínas cambian su conformación en gran medida, incrementando el número de interacciones con la superficie (Figura 4D), lo que provoca que la proteína se extienda sobre la superficie en un proceso cuasi-irreversible (Mathé et al. 2013).

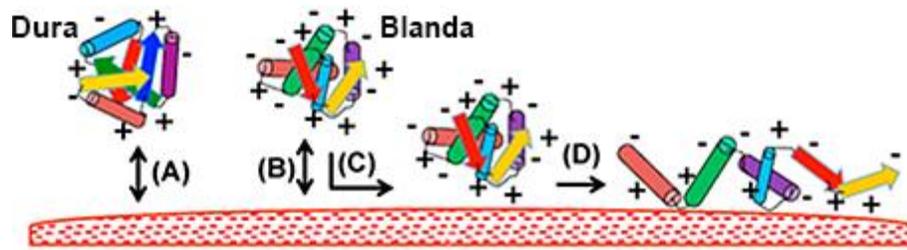


Figura 4. Esquema de las interacciones de una proteína con una superficie con carga negativa. Las interacciones entre las proteínas y la superficie se inician con interacciones electrostáticas (A) y (B). Para proteínas duras la interacción es reversible, mientras que las proteínas blandas establecen otros contactos electrostáticos (C) que conducen la propagación de la proteína en la superficie (D) de forma cuasi irreversible. Imagen modificada de (Mathé et al. 2013).

Además, el tamaño de la proteína es directamente proporcional con la velocidad de difusión desde el medio hacia la superficie, por lo que las proteínas más pequeñas predominan en la etapa de adsorción temprana; sin embargo, las más grandes se unen más fuertemente a la superficie debido a su mayor área de contacto, con lo que consiguen desplazar a las proteínas más pequeñas que previamente habían sido adsorbidas (Nakanishi et al. 2001).

De los factores ambientales, el más relevante es la temperatura, pues afecta el estado de equilibrio y la cinética de la proteína. Cuando la temperatura aumenta en un sistema, también lo hace la adsorción. Esto puede ser debido a un aumento en la movilidad de los componentes del sistema, lo que facilitaría la difusión de las proteínas a la superficie (Nakanishi et al. 2001).

El pH determina el estado electrostático de las proteínas, ya que cuando el pH es igual al punto isoeléctrico (pH_i), la carga neta de la proteína es cero existiendo el mismo número de cargas positivas y negativas. Cuando el pH es menor al pH_i , las proteínas están cargadas positivamente mientras que si el pH es mayor al pH_i , están cargadas negativamente. Las repulsiones electrostáticas proteína-proteína están

minimizadas en el punto isoelectrico permitiendo mayor densidad de adsorción sobre la superficie. La adsorción es alta cuando la superficie y la proteína tienen cargas opuestas, pues la migración de esta última hacia la superficie se ve favorecida por las atracciones electrostáticas (Nakanishi et al. 2001).

Otro factor que afecta el proceso de adsorción de proteínas es la concentración de iones disueltos expresados en términos de fuerza iónica. Los efectos electrostáticos pueden influir en la cinética de la adsorción, produciendo un incremento en la densidad de empaquetamiento, una suspensión de los efectos cooperativos o repulsiones proteína-proteína. Además, las altas condiciones de fuerza iónica aumentan la tendencia de las proteínas a agregarse (Rabe et al. 2011). Ya que los iones pueden ser diferenciados por su capacidad para precipitar proteínas en una solución, aquellos que promueven la precipitación de proteínas son denominados cosmótopos y aquellos que desaceleran la precipitación, caótopos. Este efecto se correlaciona con la capacidad para estabilizar (efecto cosmótopico) o desestabilizar (efecto caótopico) la conformación nativa de la proteína, influyendo en su tendencia a adsorberse sobre diferentes superficies (Nakanishi et al. 2001).

Finalmente, las características fisicoquímicas de la superficie del material también son factores decisivos en la adsorción de proteínas, definiendo su conformación final y su actividad una vez adsorbidas. Los parámetros más importantes corresponden a la morfología, la carga, la polaridad y la energía superficial. Las superficies no polares desestabilizan las proteínas y facilitan las reorientaciones conformacionales que conducen a interacciones fuertes entre la proteína y la superficie. Esto explicaría que la afinidad de las proteínas hacia las superficies hidrofóbicas aumenta, y por el contrario, disminuye en superficies hidrofílicas (Rabe et al. 2011).

Las superficies como el cuarzo, la mica, el vidrio, y los metales o el grafito son las más utilizadas en los estudios de adsorción de proteínas, aunque también es

posible modificarlas para construir modelos adecuados para estudios más específicos (Rabe et al. 2011).

1.4. Estudios computacionales sobre la adsorción de proteínas

Un enfoque reciente utilizado para el estudio de adsorción sobre superficies sólidas es la aplicación de métodos computacionales que simulen el comportamiento de las moléculas en interface, de forma complementaria a las técnicas experimentales. Estos métodos son tremendamente potentes, pues no tienen las limitaciones físicas ni prácticas de los métodos *in vitro*; sin embargo, como solo han sido explorados en las últimas décadas, siguen en constante desarrollo y los protocolos generalmente son variables dependiendo de los componentes del sistema.

Debido a que las técnicas de simulación molecular están limitadas por la capacidad computacional, los primeros estudios de adsorción sobre superficies sólidas no fueron realizados en proteínas, sino en átomos individuales y moléculas sencillas. Por ejemplo, se puede mencionar la investigación de Talbot et al., en la cual se realizaron dinámicas moleculares para observar el comportamiento de moléculas de N₂ al adsorberse sobre una superficie de grafito estructurado (Talbot et al. 1984), el estudio de Garofalini sobre la adsorción de moléculas de agua en una superficie de sílice con estructura vidriosa (Garofalini 1990), y la investigación llevada a cabo por Pickett et al., donde se evaluó el comportamiento de átomos de xenon en una superficie de silicalita (Pickett et al. 1990).

Yu y Lansing fueron quienes, a comienzos del nuevo milenio, reportaron los primeros resultados de simulaciones mediante dinámica molecular atomística (abreviada de aquí en adelante como DM) de adsorción de proteínas sobre

superficies de minerales arcillados. Específicamente, se reportó la interacción de pirofilita con crambina, rubredoxina y otros oligopéptidos. Como resultado, se encontró que las superficies de minerales de arcilla pueden tener un efecto desnaturalizante sobre las proteínas adsorbidas por dos razones: primero, porque son agentes deshidratantes que perturban el medio ambiente de las moléculas de agua que las proteínas globulares necesitan para mantener su estructura nativa; y segundo, porque pueden establecer interacciones no enlazantes con ellas, compitiendo eficazmente con las interacciones al interior de la cadena polipeptídica. Se debe señalar que los resultados expuestos en esta publicación solo fueron preliminares ya que los sistemas se diseñaron al vacío o casi al vacío. Otra consideración importante es que a diferencia de los estudios previos, los autores describieron que su investigación fue posible solo gracias al desarrollo de un campo de fuerza empírico para dinámicas moleculares de minerales arcillados (Yu & Lansing 2000).

Durante toda la década posterior al estudio de Yu y Lansing, Raffaini y Ganazzoli realizaron una serie de investigaciones en las cuales expusieron resultados de la adsorción de fragmentos proteicos con superficies orgánicas. En dos de ellos mostraron, mediante simulaciones moleculares, la interacción de subdominios de albúmina conformados solo por α hélices y de módulos de fibronectina que contenían solo láminas β con una superficie plana de grafito (Raffaini & Ganazzoli 2003; Raffaini & Ganazzoli 2004). Para ello realizaron DMs de larga duración en un medio dieléctrico efectivo y otras más cortas en un medio con presencia explícita de agua, estas últimas para evaluar la estabilidad geométrica y los cambios en la solvatación de las proteínas. Sus resultados sugirieron un reordenamiento significativo de las cadenas principales de los subdominios de albúmina, pero sin demasiada pérdida de la estructura ni de la globularidad, debido a que las DMs no fueron suficientemente prolongadas. Por el contrario, se observó una conservación prolongada de la estructura de los módulos de fibronectina. Estos estudios son relevantes pues en ellos se desarrolló y perfeccionó la metodología computacional que los autores seguirían utilizando en sus futuras investigaciones,

considerando otros fragmentos proteicos con composición mixta y nuevas superficies. Además, es posible replicar este protocolo en otras DMs con componentes orgánicos (Raffaini & Ganazzoli 2006a; Raffaini & Ganazzoli 2006b).

Por su parte, Wei y colaboradores llevaron a cabo estudios de adsorción de lisozima mediante DM buscando determinar cuál era el tiempo necesario para evaluar el proceso completo de adsorción de esta proteína sobre una superficie de polietileno en un ambiente acuoso. Analizaron la deformación estructural de la proteína y su movilidad luego de adsorberse sobre la superficie hidrofóbica. Para ello dividieron el proceso en tres etapas: transporte hasta la superficie, deshidratación y deformación después del contacto con la superficie. Los resultados de la simulación mostraron que la lisozima conservó sus estructuras secundarias y terciarias durante el transporte a la superficie. Luego, durante la deshidratación, la proteína comenzó a deformarse por el desplazamiento de residuos hidrófobos hacia la superficie. Este proceso de deformación continuó hasta el final de la trayectoria de simulación. En sus resultados observaron que a los 300 ns hubo una expansión hacia una estructura completamente alargada respecto a su conformación nativa, con una pérdida significativa de α hélices, pero aun conservando la mayor parte de las láminas β . La movilidad de la proteína en la superficie siguió la estructura cristalina del sustrato, induciendo una difusión preferencial en paralelo a las cadenas de polietileno. A partir de estos resultados concluyeron que se requieren mayores tiempos de simulación para observar completamente el proceso de adsorción *in silico* (Wei et al. 2011).

Luego, Mücksch y Urbassek expusieron sus resultados sobre la adsorción de la proteína albúmina de suero bovino sobre una superficie de grafito hidrófobo usando técnicas de DM. Además del método clásico, es decir, la dinámica molecular no dirigida, también utilizaron la adsorción forzada, en la que se modeló la acción del *tip* de un microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) que empujaba con fuerza constante a la proteína sobre la superficie. El modelo implícito de agua, la dinámica de adsorción y la energía del sistema fueron monitoreados usando dos orientaciones iniciales diferentes, y en ambos casos la proteína se desplegó

parcialmente y se extendió sobre la superficie. La desnaturalización, sin embargo, incrementó en gran medida en los casos en que se utilizó la adsorción forzada. En estas últimas se analizó el *lipid-binding pocket* (bolsillo de unión de lípidos) de la proteína durante la dinámica y se observó que independiente de la orientación inicial, este siempre se movió hacia la superficie de grafito, interactuando con ella, por su carácter hidrofóbico (Mücksch & Urbassek 2011).

Posteriormente, Kubiak-Ossowska y Mulheran realizaron estudios de la adsorción de múltiples estados oligoméricos de la lisozima de clara de huevo en una superficie iónica cargada, utilizando simulaciones de DM. Para ello construyeron sistemas con dos, tres y cinco subunidades de la proteína en diversas orientaciones con respecto a la superficie, con tiempos de simulación del orden de los 100 ns. También estudiaron modelos de proteínas con mutaciones puntuales en algunos residuos ubicados en los sitios de adsorción, con lo que consiguieron dilucidar el rol de los aminoácidos sustituidos en las interacciones proteína-superficie. Durante el tiempo de simulación, se observó rotación, adsorción y agregación de los oligómeros. Además, el estudio incorporó el análisis de dos procesos cooperativos: la adsorción y la agregación proteína-proteína. Concluyeron que a baja concentración de proteínas, estas se adsorben de forma aislada y se reorientan en la superficie, para luego agregarse. A una alta concentración, en cambio, la agregación ocurre en la solución y a continuación se adsorben de forma no específica. Este estudio es de gran relevancia, pues, a diferencia de los anteriores, se trabajó por primera vez a nivel multiproteico (Kubiak-Ossowska & Mulheran 2011).

Por otro lado, Mücksch y Urbassek volvieron a proponer una nueva metodología para desarrollar más extensamente el fenómeno de adsorción *in silico*. Esta vez, los autores utilizaron el método de dinámica molecular acelerada, con el fin de reducir las limitaciones en escala de tiempo de las DMs. La técnica fue utilizada en simulaciones que ofrecieron como resultado estados de adsorción equilibrados de la proteína morfogénica ósea 2, sobre una superficie de grafito en medio acuoso y salino. Con este sistema lograron demostrar, debido a que el muestreo del espacio

conformacional mejoró considerablemente, que la dinámica molecular acelerada permite modelar el despliegue completo y la difusión de la proteína en la superficie de grafito hidrofóbico, exponiendo diferentes conformaciones “finales” de adsorción. Este resultado se correlacionó directamente con lo observado experimentalmente respecto a la desnaturalización de proteínas tras el contacto con superficies hidrofóbicas (Mücksch & Urbassek 2013).

Otro estudio de relevancia en esta área fue realizado por Javkhlantugs y Bayar. En él, los autores señalaron que tener una comprensión teórica de la orientación de las inmunoglobulinas inmovilizadas sobre superficies sólidas es importante en los sistemas biomédicos para la detección de patógenos y en el análisis celular. También indicaron que a pesar de que la adsorción estable de inmunoglobulinas sobre superficies de poliestireno se ha aplicado en muchos tipos de inmunoensayos, aún existe incertidumbre en la sensibilidad de los métodos experimentales clínicos y biológicos basados en anticuerpos. Por esta razón, para entender el mecanismo de unión y las interacciones fisicoquímicas proteína-superficie a nivel atómico, desarrollaron su investigación utilizando métodos computacionales. En las simulaciones de adsorción que realizaron con diferentes disposiciones de traslación y rotación del anticuerpo, encontraron tres patrones de orientación típica de IgG sobre el poliestireno. El análisis de estos patrones condujo a proponer que las principales fuerzas de la adsorción provienen de la interacción de la superficie con los residuos serina, ácido aspártico y ácido glutámico. (Javkhlantugs & Bayar 2013).

A diferencia de las investigaciones realizados hasta ese momento, en que se utilizaron técnicas de DM, Wei y Knotts presentaron un nuevo método para estudiar las interacciones proteína-superficie que incorporó la especificidad química en un contexto *coarse-grained one-bead-per-residue*. Esto permitió incrementar la eficiencia computacional de las simulaciones mediante el remplazo de la descripción atomística del sistema por modelos de grano grueso de baja resolución, uno para cada residuo. La parametrización se realizó con energías experimentales de adsorción para múltiples péptidos modelos en diferentes tipos de superficie. La

validez del modelo se estableció por su capacidad de predecir cuantitativamente y cualitativamente la energía libre de adsorción y los cambios estructurales para múltiples proteínas biológicamente relevantes en múltiples superficies. La validación, hecha con proteínas que no se ocuparon en la parametrización, mostró que el modelo fue notablemente similar con lo reportado en experimentos (Wei & Knotts 2013).

Finalmente, Penna et al., haciendo uso de mayor potencia computacional, realizaron más de 240 simulaciones de DM en sistemas conformados por dos péptidos, agua y una superficie sólida, para hacer un análisis estadístico de ellas. Los autores lograron identificar un mecanismo generalizado, a nivel molecular, para la adsorción de péptidos sobre superficies no cargadas. Este se compuso de tres fases: primero, la difusión parcial de los péptidos desde la solución hacia la superficie; segundo, su anclaje a la interface agua-sólido a través de la interacción entre algún grupo hidrofílico y el agua adyacente a la superficie o un grupo hidrofóbico que interactúe fuertemente con el material; y tercero, el bloqueo del péptido sobre la superficie a través de un proceso adsorción lento, gradual y secuencial, al que denominaron *zippering estadístico*. De esta forma revelaron que el mecanismo de adsorción sobre una superficie sin carga es dirigido por el ordenamiento orientacional de capas de agua adyacentes al sólido (Penna et al. 2014).

1.5. Propiedades de la caolinita como adsorbente

El grupo de los filosilicatos (en el que están incluidos la caolinita, la moscovita, la pirofilita, las montmorillonitas, entre otros), es considerado uno de los más relevantes, por las funciones naturales e industriales que tienen los minerales que lo componen. Por ser constituyentes elementales de suelos, rocas y sedimentos, los filosilicatos tienen la capacidad de retener varios contaminantes del agua

subterránea, así como de remediar suelos de cultivo de protoxinas o proteínas tóxicas, debido a la preferencia que muestran por ellos (Bhattacharyya & Gupta 2008; Yu et al. 2000). Estos procesos están mediados principalmente por el intercambio iónico y por los mecanismos de adsorción (Bhattacharyya & Gupta 2008).

Los minerales de filosilicato consisten básicamente en estructuras cristalinas conformadas por dos tipos de capas: la capa tetraédrica de silicio y la capa octaédrica de aluminio o de magnesio. Dependiendo de la proporción entre ellas, los filosilicatos pueden ser clasificados como filosilicatos de tricapa (tipo 2:1) o de bicapa (tipo 1:1), y estos últimos, a su vez, en dioctaédricos o trioctaédricos dependiendo de si el átomo en el centro de sus octaedros es un aluminio o un silicio, respectivamente (Liu 2015).

La carga de un filosilicato está determinada principalmente por la naturaleza de su estructura cristalina, por las sustituciones isomórficas que posea, por la capacidad de acomodación de cationes en sus regiones interlamina, por su capacidad de intercambio catiónico y por la composición del medio (Liu 2015); mientras que su capacidad para interactuar con otros compuestos depende de factores como su composición química, la naturaleza de los átomos que tenga expuestos, sus defectos y por la carga y tipo de catión intercambiado.

La caolinita $[Al_2Si_2O_5(OH)_4]$, el material elegido para esta investigación, posee una estructura laminar anisotrópica 1:1 del tipo dioctahédrica, con una baja capacidad de intercambio iónico. Las partículas de este material constan de tres capas superficiales: la capa basal plana tetraédrica de silicio, la capa basal plana octaédrica de aluminio y la capa de borde (Liu 2015), tal como se muestra en la Figura 5. Respecto a su carga, las conclusiones recientes son ambiguas, debido a que su punto de carga cero (PZC, por su sigla en inglés) varía de acuerdo a las contribuciones individuales de cada una de sus capas. Según lo reportado por Gupta y Miller, el pH_i de la capa basal de aluminio varía entre los pH 6 y 8, y el de la capa

basal de silicio es menor a 4 (Gupta & Miller 2010). Para la capa de borde, por su dificultad para ser estudiada, se han reportado diferentes valores que varían entre los pH 4,5 y 7,5 (Rand & Melton 1975; Kretzschmar et al. 1998; Gupta et al. 2011). Otro dato relevante respecto a la caolinita es que la capa basal de silicio ha sido descrita como relativamente hidrofóbica, mientras que la capa basal de aluminio como hidrofílica, lo cual fue verificado por estudios de DM (Yin et al. 2012).

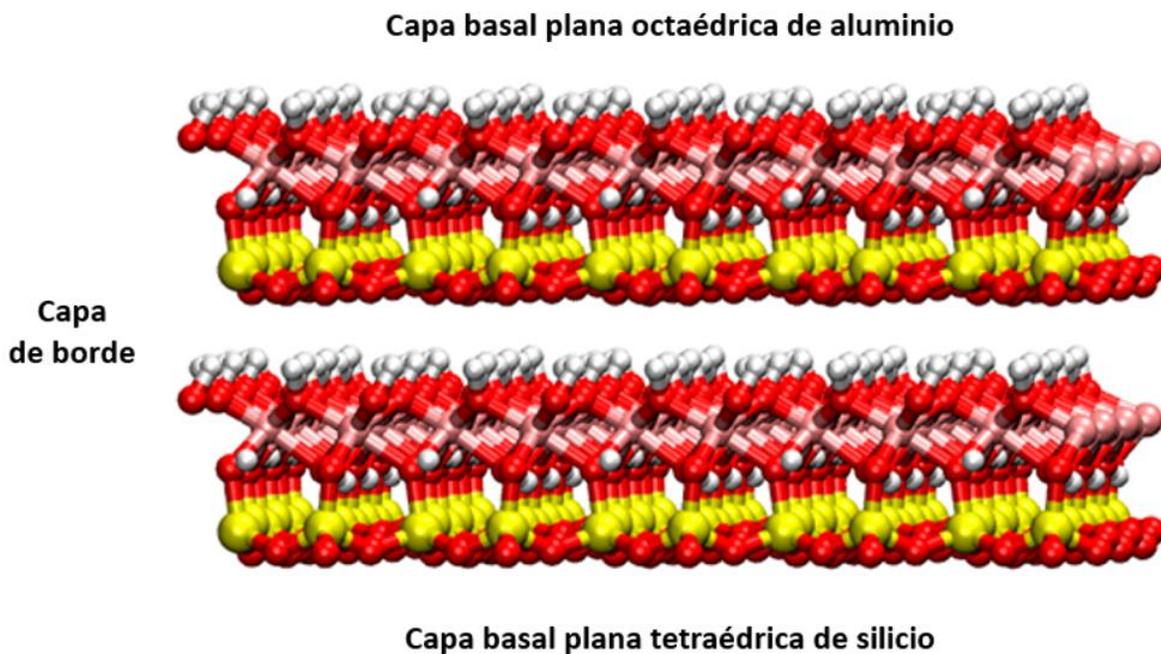


Figura 5. Superficie de caolinita de 5×3×2 celdas unitarias. El rojo representa los átomos de oxígeno, el amarillo los de silicio, el rosa los de aluminio y el blanco los de hidrógeno.

1.6. Propiedades la IgG1 como adsorbato

Las inmunoglobulinas, también conocidas como anticuerpos, son un pequeño grupo de glicoproteínas producidas en los plasmocitos. Ellas juegan un rol crítico en

la respuesta inmunológica, mediante el reconocimiento específico y la unión a antígenos particulares tales como virus o bacterias, promoviendo su destrucción (Dominguez & Holmes 2011).

El peso de las inmunoglobulinas varía entre los 146 y 188 kDa cuando son monoméricas, por lo que se consideran proteínas “grandes” y su composición es 82-96% proteica y 4-8% sacarídica. La parte proteica está formada por una estructura de cuatro cadenas, 2 de ellas “pesadas” (H) y 2 “ligeras” (L) las cuales son idénticas entre sí, mientras que la parte sacarídica está formada por 2 N-glicanos unidos a las cadenas H (Stadlmann et al. 2008; Meulenbroek 2008). La región N-terminal de las cadenas H y L se caracterizan por tener una composición aminoacídica variable, las cuales son denominadas regiones H_V y L_V , respectivamente. La región constante de las cadenas L se denomina L_C , mientras que la región constante de las cadenas pesadas están divididas en tres subunidades: H_{C1} , H_{C2} y H_{C3} . Tanto las regiones variables de ambas cadenas, como la subunidad constante H_{C1} se encuentran en la fracción de las inmunoglobulinas que se unen al antígeno (Fab), mientras que las subunidades H_{C2} y H_{C3} están posicionadas en la fracción cristalizable (Fc). La sección que une las fracciones Fab con la fracción Fc es denominada región bisagra (*hinge*, en inglés). Por último, la estabilidad de la macromolécula es mediada por puentes disulfuros inter- e intracatenarios, cuya cantidad y disposición varía de acuerdo al isotipo y subclase de anticuerpo (Figura 6A) (Vidarsson et al. 2014; Stadlmann et al. 2008; Liu & May 2012; Meulenbroek 2008).

Además de las funciones inherentes que cumplen en el organismo, determinadas por las variaciones particulares de cada anticuerpo (Vidarsson et al. 2014; Stadlmann et al. 2008), las inmunoglobulinas han sido utilizadas con propósitos clínicos y experimentales. En técnicas de inmunoensayo, las inmunoglobulinas son modificadas mediante un proceso denominado Producción de Anticuerpos, el cual involucra como paso más importante la adición de un *tag* que le otorga la capacidad de detectar y unirse selectivamente a un antígeno específico de interés biológico (Thermo Scientific 2010). En el caso de los Ensayos por

Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), un antígeno es inmovilizado por un anticuerpo que se encuentra adsorbido sobre una fase sólida (al cual se llama anticuerpo primario), para su posterior reconocimiento por un segundo anticuerpo (denominado anticuerpo secundario), capaz de generar un producto detectable y cuantificable. Debido a la diversa cantidad de aplicaciones que tiene ELISA, comprender los factores que describen el proceso de adsorción de las inmunoglobulinas es fundamental para el entendimiento y el futuro mejoramiento de la técnica.

A pesar que los factores que controlan la adsorción de proteínas son variados, en las inmunoglobulinas pertenecientes al isotipo G (IgG) (Figura 6B), se han observado características importantes asociadas a este fenómeno. Según lo publicado por Meulenbroek, la mayor diferencia entre la composición aminoacídica y estructura tridimensional de las distintas subclases de IgG ocurre en la región bisagra, lo cual tiene directa implicancia en la movilidad de la proteína. Esta región, junto con las subunidades Hc₂ y Hc₃, determinan la flexibilidad de la molécula permitiéndole alterar en mayor o menor medida el ángulo y las rotaciones de sus fragmentos Fab, así como sus posiciones relativas respecto al fragmento Fc y las oscilaciones de este último dominio. Todos estos comportamientos son fundamentales para el cumplimiento de las funciones efectoras de la IgG, tales como la unión al complemento y la unión al receptor del fragmento Fc (Meulenbroek 2008).

En los capítulos siguientes se describe el procedimiento utilizado para la creación de la metodología que permitió estudiar las primeras etapas del proceso de adsorción del anticuerpo IgG1 sobre una superficie sólida de caolinita, usando técnicas de DM.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

El diseño y uso de una nueva metodología basada en la técnica de DM permite estudiar el proceso de adsorción de la proteína IgG1 sobre una superficie sólida de caolinita.

2.2. Objetivo general

Diseñar una metodología que permita evaluar el proceso de adsorción de la proteína IgG1 sobre una superficie sólida de caolinita, mediante simulaciones de DM.

2.3. Objetivos específicos

1. Diseñar una superficie de caolinita con las dimensiones adecuadas para la adsorción de la proteína IgG1.
2. Analizar la estabilidad estructural de la superficie de caolinita en una caja de agua, mediante simulaciones de DM.
3. Reconstruir la estructura tridimensional de los subdominios de la proteína IgG1 mediante modelamiento por homología.

4. Analizar la estabilidad estructural de la proteína IgG1 en una caja de agua, mediante simulaciones de DM.
5. Obtener la orientación inicial de la adsorción de la proteína IgG1 sobre la superficie de caolinita, mediante el análisis teórico de las interacciones no enlazantes.
6. Modelar el proceso de adsorción de la proteína IgG1 sobre la superficie de caolinita en una caja de agua, mediante simulaciones de DM.

3. Materiales y metodología

El estudio del fenómeno de adsorción por medio de técnicas computacionales es un enfoque relativamente reciente, por lo tanto no existe un protocolo pre-establecido para la construcción de los modelos moleculares que se utilizan. Diferentes autores han propuesto sus propios procedimientos en correspondencia con la capacidad computacional disponible, la naturaleza y complejidad del modelo, el nivel de detalle esperado en la descripción de las interacciones, el tiempo de simulación, entre otros factores.

Los estudios realizados usando dinámica molecular como método de simulación han sido diferenciados en dos grupos de acuerdo a la técnica utilizada. Estas técnicas logran aportar con niveles de caracterización de mayor o menor detalle a cambio de costo computacional y tiempo de simulación. Por un lado, *coarse-grained* se enfoca en cálculos que describan el comportamiento a una larga escala temporal, que entregan resultados generales (Raffaini & Ganazzoli 2003; Raffaini & Ganazzoli 2004; Ganazzoli & Raffaini 2005), mientras mantienen la eficiencia computacional y conservan la estabilidad de la proteína durante la simulación del proceso de plegado y desplegado (Wei & Knotts 2013). Por otro lado, las simulaciones atomísticas son utilizadas para describir las interacciones específicas de una proteína con una superficie a escala nanométrica, entregando mayor detalle a nivel atómico, pero teniendo como factor crítico el tamaño del sistema modelado (en número de átomos) y el tiempo máximo de simulación, por su mayor costo computacional. A pesar de esto, solo las simulaciones atomísticas pueden proporcionar una descripción completa de las fuerzas de interacción fundamentales involucradas en el proceso de adsorción (Raffaini & Ganazzoli 2003).

3.1. Hardware

Para la elaboración y ejecución de los *script* presentados en este estudio y para la construcción de los sistemas se utilizó una *laptop* Samsung NP350V4C-07CL:

- ♦ **Procesador:** Intel Core i5 3210M (2500 MHz - 3100 MHz)
- ♦ **RAM:** 6GB DDR3 (1600MHz)
- ♦ **Almacenamiento:** HDD 750 GB (5400rpm)
- ♦ **Tarjetas de video:** AMD Radeon HD 7670M (1GB); Intel GMA HD Graphics 4000 (integrada)
- ♦ **Sistema operativo:** Ubuntu 14.04 LTS (Trusty Tahr)

y para los cálculos de DM se utilizó uno de los nodos del cluster NIMBUS, del Laboratorio de Biología Estructural y Nanofisiología del Departamento de Fisiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, el cual está basado en un sistema Enclosure DELL POWEREDGE BLADE M1000E:

- ♦ **Conexión:** x Switch Force 10 con puertos de 10GbE
- ♦ **Procesadores:** 8x Dell Poweredge M915 Compute nodes (64 procesadores por nodo)
- ♦ **Velocidad de procesamiento:** 2,1 GHz
- ♦ **Servidor:** M915
- ♦ **RAM:** 128 GB por nodo
- ♦ **LOM:** Intel x520-k 2 Port 10 GB K
- ♦ **Almacenamiento:** HDD 2 TB por nodo
- ♦ 6 Fuentes de poder
- ♦ 9 ventiladores activos
- ♦ 2 controladoras de Chassis CMC
- ♦ 1 iKVM Avocent

3.2. Software

- ♦ **Geany 1.28:** Editor de texto con las características básicas de un entorno de desarrollo integrado. Fue desarrollado para proporcionar un IDE rápido y ligero, con pocas dependencias de otros paquetes. Se caracteriza por su compatibilidad con una gran cantidad de archivos (Tröger 2015).
- ♦ **Modeller 1.16:** Programa usado para realizar modelamientos por homología a partir de un alineamiento de secuencias entre una proteína de estructura desconocida y otra de estructura conocida relacionada. (Eswar et al. 2007).
- ♦ **VMD 1.9.2:** Programa de visualización molecular para ver, animar y analizar grandes sistemas biomoleculares utilizando gráficos tridimensionales y secuencias de comandos incorporado. (Humphrey et al. 1996).
- ♦ **NAMD 2.9:** Programa de código paralelo diseñado para la ejecución de dinámicas moleculares de alto rendimiento, principalmente para sistemas biomoleculares (Phillips et al. 2005).
- ♦ **Gnuplot 5.0.3:** Aplicación portable manejada por línea de comandos para la visualización de funciones matemáticas y datos de forma interactiva y no interactiva (Williams & Kelley 2015).

3.3. Selección del campo de fuerza

Una de las mayores dificultades en el modelado de sistemas que contienen interfaces orgánicas-inorgánicas o biomoleculares-inorgánicas es el cálculo preciso de la expresión energética (Hamiltoniano molecular), el cual permite calcular las propiedades termodinámicas del sistema (Heinz et al. 2013). En simulaciones moleculares, la expresión energética se obtiene a partir de conjunto de parámetros, ecuaciones y constantes reunidas en una expresión matemática denominada función de energía potencial o campo de fuerza.

Un campo de fuerza define las expresiones que determinan la energía involucrada en las interacciones enlazantes y no enlazantes entre todas las partículas definidas en el sistema modelado. Entre las interacciones enlazantes es común encontrar potenciales para describir vibraciones de enlaces, ángulos de enlace y dihedros. Los campos de fuerzas también deben incluir términos no enlazantes para describir interacciones electrostática, inductivas y dispersivas, y de Van der Waals entre todos los pares de partículas.

Con la evolución del poder computacional desde la década de 1980, se han desarrollado diversas especializaciones de campos de fuerza para moléculas de diferente naturaleza. La especialización consiste en ajustar con parámetros todas las funciones contenidas en el campo de fuerza, tal que reproduzcan los datos experimentales o propiedades conocidas de un conjunto. Los campos de fuerza armónicos (que incluyen este tipo de funciones para los términos enlazantes), por ejemplo, reproducen muchas propiedades de proteínas, carbohidratos, ADN, solventes, drogas, surfactantes y polímeros en amplia concordancia con experimentos. Otros, como los campos de fuerza de Buckingham y Lennard-Jones (que poseen funciones para describir las interacciones dispersivas entre pares de partículas), han sido creados para minerales y polímeros. La mayoría de los metales se modelan con la función de energía potencial del Método del Átomo Embebido (EAM, según sus siglas en inglés) y las reacciones químicas con el campo de fuerza ReaxFF; sin embargo, estas expresiones de energía especializadas están restringidas a un número limitado de compuestos y su pobre compatibilidad y transferencia hace que resulte sumamente difícil reunir las en una única expresión energética tanto para moléculas orgánicas como inorgánicas (Heinz et al. 2013).

Por lo anterior, para las simulaciones de DM propuestas en los objetivos específicos 2, 4 y 6, se utilizó el campo de fuerza atomístico INTERFACE v1.5, desarrollado por el laboratorio de Heinz en la Facultad de Ciencia de Polímeros e Ingeniería de Polímeros de la Universidad de Akron, USA; y publicado el 24 de

marzo del 2015 (Heinz et al. 2013). INTERFACE contiene una colección de parámetros termodinámicamente consistentes para compuestos orgánicos al cual se le han incorporado otros para compuestos inorgánicos, tras una validación individual exhaustiva. Ha sido desarrollado para simulaciones de nanoestructuras de escala de 1 a 100 nm (nivel al cual se ejercen las fuerzas químicas y físicas que se observan a nivel macroscópico), con una precisión que ha logrado reducir las desviación en hasta dos órdenes de magnitud comparado con campos de fuerza alternativos, en relación con los datos experimentales (Heinz et al. 2013).

3.4. Creación y preparación de la superficie de caolinita para la DM

3.4.1. Obtención del modelo de la superficie de caolinita

Para obtener el modelo de caolinita se desarrolló el *script* kaoliniteSurfGen.pl (Anexo 1), el cual, a partir de la celda unitaria de este material, generó una lámina de 200x200x5 Å³ en dos archivos: kaolinite_38x22_R.car, con la información de la posición de los átomos y kaolinite_38x22_R.mdf, con su estructura molecular. El tamaño fue elegido teniendo en cuenta las dimensiones de la IgG1, de forma tal que no estableciera interacciones consigo misma durante la DM del modelo que incluyera la proteína y la superficie, por las condiciones periódicas de borde.

Posteriormente, los archivos kaolinite_38x22_R.car y kaolinite_38x22_R.mdf fueron transformados a los formatos .pdb y .psf, respectivamente, pues estos son compatibles con NAMD (Tim et al. 2012). Para la conversión se utilizaron dos softwares incluidos en el paquete que el laboratorio de Heinz puso a disposición de la comunidad científica junto con el campo de fuerza INTERFACE: El primero, llamado msi2Imp_gcc32.exe, transformó los archivos kaolinite_38x22_R.car y kaolinite_38x22_R.mdf en un solo archivo de nombre kaolinite_38x22_R.lammps05; el segundo software, car_imp_TO_pdb_psf.exe, transformó el archivo

kaolinite_38x22_R.lammps05 a los archivos finales kaolinite_38x22_R.pdb y kaolinite_38x22_R.psf.

3.4.2. Obtención del modelo de la superficie de caolinita en agua

A partir de los archivos de entrada de la lámina de caolinita para NAMD, se diseñó un sistema con la superficie y se introdujo una caja de agua de modelo TIP3P sobre ella, con 20 Å de alto para evitar interacciones no enlazantes consigo misma durante la DM en condiciones periódicas de borde. En los ejes *x* e *y* las dimensiones fueron aproximadamente 200 Å, al igual que las de la superficie. El tamaño total del sistema fue 200x200x25,25 Å³ y de los 101001 átomos que lo componen 28424 corresponden a la caolinita y 72577 al solvente.

La solvatación mencionada en el párrafo anterior fue hecha con el *script* para VMD solvate.tcl (Anexo 2), el cual requiere de *plugin* psfgen para generar los archivos .pdb y .psf del sistema con las moléculas de agua. Debido a que psfgen no puede distinguir los nombres de los átomos de la caolinita, pues son distintos a los que poseen los sistemas orgánicos, no les asignó correctamente sus coordenadas en el archivo kaolinite_38x22_R_WB.pdb. En su lugar, todos fueron desplazados al punto (0,0,0) del plano cartesiano. Para corregir este error se elaboró otro *script*, al que se denominó replaceCoordinates.pl (Anexo 3). Este recibe como entrada dos archivos: kaolinite_38x22_R.pdb y kaolinite_38x22_R_WB.pdb. Del primero extrae las coordenadas atómicas correctas y las reemplaza por las incorrectas en el segundo. Una representación gráfica del sistema puede verse en la Figura 7.

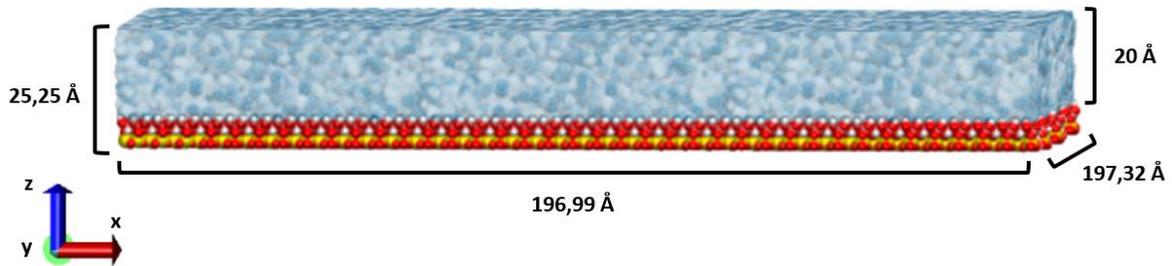


Figura 7. Superficie de caolinita en una caja de agua (archivos kaolinite_38x22_R.pdb y kaolinite_38x22_R_WB.pdb).

Para mayor comprensión del proceso de modelado de la superficie de caolinita en agua, la Figura 8 muestra un diagrama de flujo que indica el orden en el que fueron ocupados los *scripts*, considerando los ficheros que recibieron como entradas y los que generaron como salida. Cabe señalar que el nombre de los archivos puede variar, si el usuario lo desea, al usar los códigos en una metodología diferente.

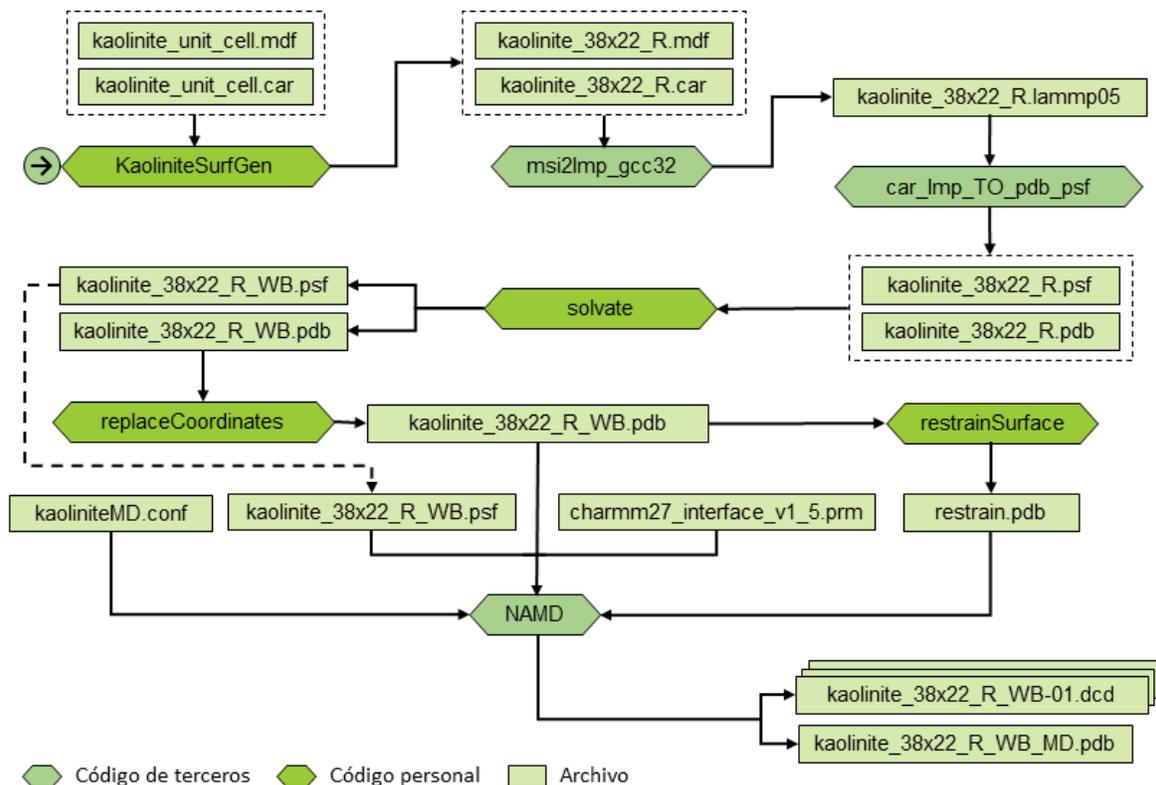


Figura 8. Diagrama de flujo que explica el proceso de creación y simulación de una superficie de caolinita en agua usando los *scripts* desarrollados para esta investigación y otros de terceros. Se han omitido los archivos de registro .log.

3.5. Reconstrucción y preparación del modelo de la IgG1 para la DM

3.5.1. Obtención del modelo de la IgG1

Debido a que la estructura de la IgG1 b12 posee regiones que no pudieron ser definidas (*gaps*) mediante cristalografía de rayos X, fue necesario hacer un modelamiento por homología para reconstruir sus subdominios. El procedimiento se realizó con el software Modeller v9.16, utilizando como molde la estructura tridimensional incompleta, la cual se comparó con su propia secuencia aminoacídica

para generar el nuevo modelo de la proteína. Al archivo obtenido, el cual contiene las coordenadas atómicas de todos los residuos, se le nombró 1HZH_M.pdb.

A continuación, se adicionó a cada una de las cadenas de la proteína el grupo N-terminal en su forma protonada, el grupo C-terminal en su forma desprotonada y los residuos de histidina fueron modelados en su estado no ionizado (HSD), tal como se encuentra la proteína en una solución a pH neutro. (Javkhlantugs & Bayar 2013). Finalmente, se establecieron los puentes disulfuros propios de este tipo de inmunoglobulinas (Liu & May 2012) (Figura 6A) y se agregaron los átomos de hidrógeno. Todo lo anterior se realizó con el *script* para VMD PSFProtein.tcl (Anexo 4), el cual, utilizando la estructura 1HZH_M.pdb y el archivo de topología top_all27_prot_na.rtf, entregó como resultado los archivos 1HZH_M_RU.pdb y 1HZH_M_RU.psf.

3.5.2. Obtención del modelo de la IgG1 en agua

Se diseñó una caja de agua de $144 \times 138 \times 196 \text{ \AA}^3$ alrededor de la IgG1 de los archivos 1HZH_M_RU.pdb y 1HZH_M_RU.psf, con moléculas de agua modelo TIP3P, usando una vez más el *script* solvate.tcl. A los nuevos ficheros se les denominó 1HZH_M_RU_WB.pdb y 1HZH_M_RU_WB.psf. El tamaño de la caja fue escogido teniendo en cuenta las dimensiones de la proteína: 15 Å de distancia a partir del último átomo en cada dirección del plano cartesiano para evitar que formara interacciones no enlazantes consigo misma durante la DM en condiciones periódicas de borde. De los 375739 átomos que contiene este sistema, 20602 corresponden a la proteína y 355137 al agua. Una representación esquemática del modelo a utilizar se muestra en la Figura 9.

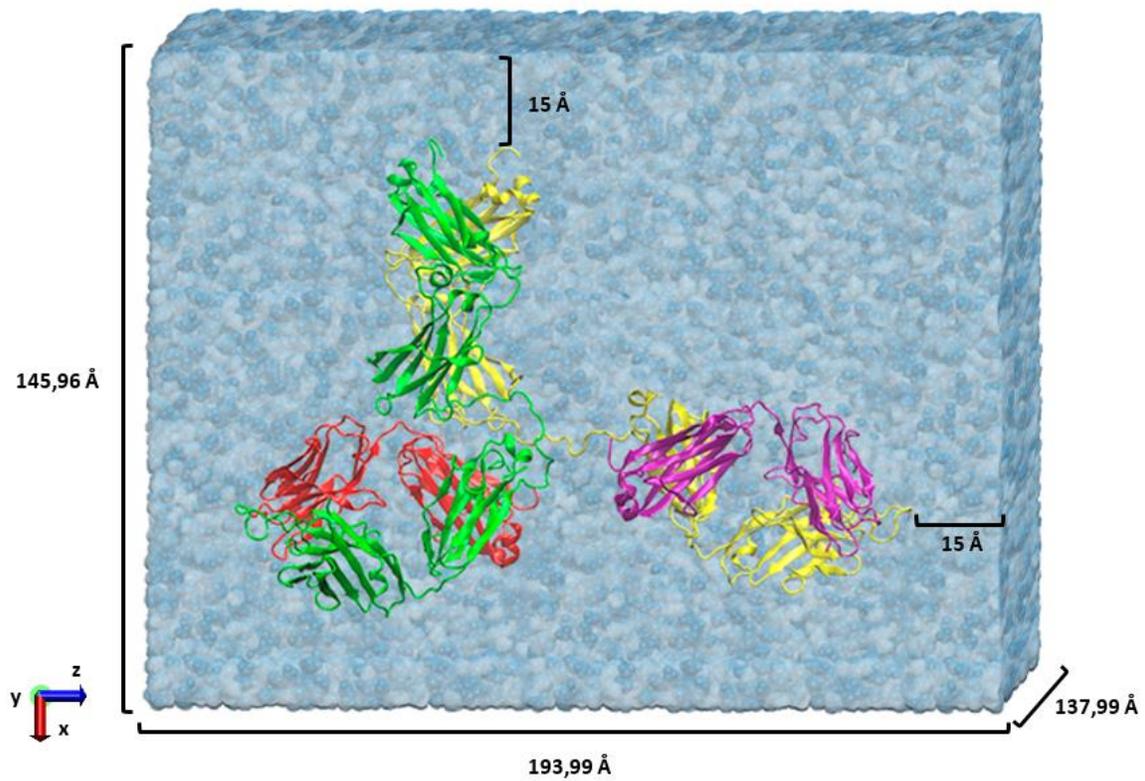


Figura 9. Proteína IgG1 b12 en una caja de agua (archivos 1HZH_M_RU_WB.pdb y 1HZH_M_RU_WB.psf).

Para mayor comprensión del proceso de modelado de la IgG1 en agua, la Figura 10 muestra un diagrama de flujo que indica el orden en el que fueron ocupados los *scripts*, considerando los ficheros que recibieron como entradas y los que generaron como salida.

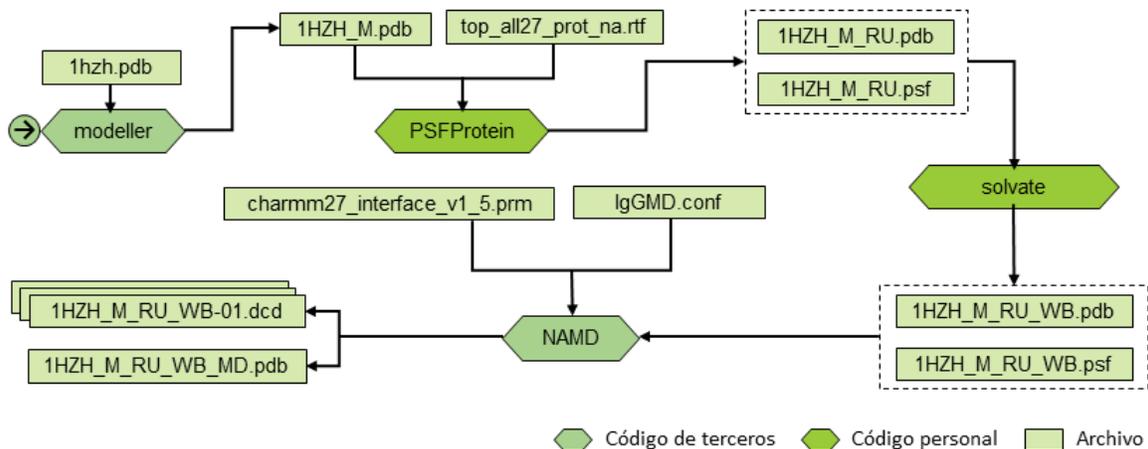


Figura 10. Diagrama de flujo que explica el proceso de reconstrucción y simulación de la IgG1 b12 (PDB: 1hzh.pdb) en agua, usando los *scripts* desarrollados para esta investigación y otros de terceros. Se han omitido los archivos .log.

3.6. Preparación del modelo con la IgG1, la superficie de caolinita y el agua para la DM

Para construir el sistema que contiene la IgG1, la lámina de caolinita y el agua, se generaron dos archivos de coordenadas .pdb, uno de la superficie y otro de la proteína, luego de 10 ns de producción de sus DMs individuales. Se utilizaron estas nuevas configuraciones espaciales para tener de ambas una conformación más cercana al equilibrio en el medio acuoso, con los efectos térmicos ya incluidos. A los archivos se les denominó kaolinite_38x22_R_MD.pdb y 1HZH_M_RU_MD.pdb respectivamente.

Luego, se buscó la orientación más favorable de la proteína sobre la superficie, con el objetivo de favorecer las interacciones entre ambas y así evitar realizar un muestreo con varias estructuras de partida, pues esto implica un costo computacional elevado. Para este propósito se utilizó el *script* para VMD

proteinInitialPosition.tcl (Anexo 5), que recibió como entrada los archivos 1HZH_M_RU_MD.pdb y kaolinite_38x22_R_MD.pdb, y generó el archivo 1HZH_M_RU_MD_IP.pdb, con la nueva orientación y posición de la IgG1. Por su importancia, el funcionamiento y los resultados de este *script* se comentarán con más detalles en el siguiente capítulo.

Posteriormente, se solvató la proteína en su nueva posición utilizando una vez más el *script* solvate.tcl, configurando la caja de agua para que sus dimensiones en los ejes **x** e **y** fueran del mismo tamaño que la superficie representada en el archivo kaolinite_38x22_R_MD.pdb. Además, se consideró una capa de agua de 30 Å por sobre el último átomo de la proteína en el eje **+z**, para evitar que esta interactuara con la capa basal de silicio de la lámina generada por las condiciones periódicas de borde. Los archivos que solvate.tcl utilizó como entrada fueron 1HZH_M_RU_MD_IP.pdb, 1HZH_M_RU.psf, y los generados se nombraron 1HZH_M_RU_MD_IP_WB.pdb y 1HZH_M_RU_MD_IP_WB.psf.

A continuación, con el módulo Merge Structures, incluido en VMD, se unieron los archivos de la proteína, 1HZH_M_RU_MD_IP_WB.pdb y 1HZH_M_RU_MD_IP_WB.psf, con los de la superficie, kaolinite_38x22_R_MD.pdb y kaolinite_38x22_R.psf, en dos nuevos: 1HZH_kaolinite_WB.pdb y 1HZH_kaolinite_WB.psf. Sin embargo, Merge Structures también utiliza el *plugin* psfgen, por lo que 1HZH_kaolinite_WB.pdb presentó el mismo desplazamiento de los átomos de la superficie al punto (0,0,0) ya observado. Esto fue corregido una vez más con el *script* replaceCoordinates.pl, que entregó el archivo de coordenadas atómicas definitivo para este sistema (Figura 11). De esta forma, el sistema completo quedó compuesto por 587008 átomos, de los cuales 20602 corresponden a la proteína, 28424 a la superficie y 537982 al agua.

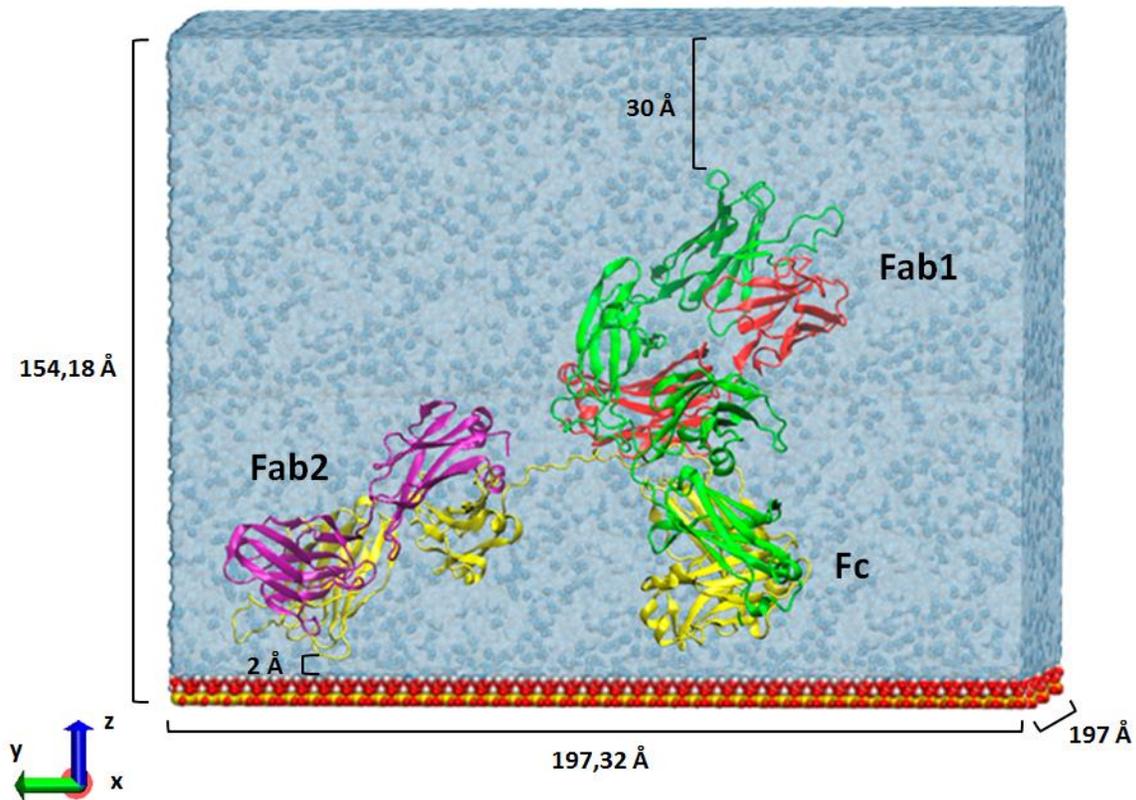


Figura 11. Superficie de caolinita y proteína IgG1 b12 en una caja de agua (archivos 1HZH_kaolinite_WB.pdb y 1HZH_kaolinite_WB.psf). Los nombres Fab1 y Fab2 fueron elegidos arbitrariamente para mayor comprensión del análisis posterior.

Para mayor comprensión del proceso de modelado del sistema que incluye la IgG1 y la superficie de caolinita en agua, la Figura 12 muestra un diagrama de flujo que indica el orden en el que deben ser ocupados los *scripts*, considerando los archivos que recibieron como entradas y los que generaron como salida.

Todos los modelos fueron construidos sin la incorporación de iones en el medio, ya que los estudios de adsorción son realizados en condiciones de agua desionizada (agua ultrapura de tipo I) (Barrera et al. 2005).

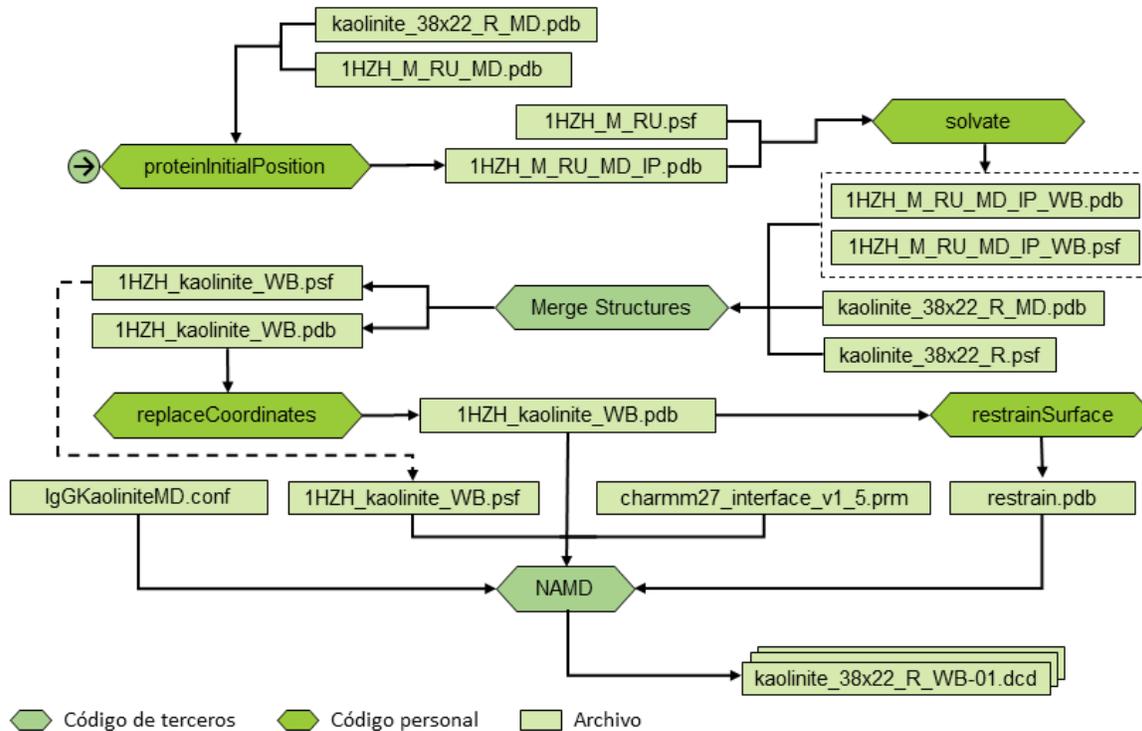


Figura 12. Diagrama de flujo que explica el proceso de creación y simulación de sistema compuesto por una superficie de caolinita, una IgG1 b12 y agua, usando los *scripts* desarrollados para esta investigación y otros de terceros. Se han omitido los archivos .log.

3.7. Protocolo para las DMs

Se realizaron tres simulaciones de DM: una para la superficie de caolinita en una caja de agua, otra para la proteína IgG1 en una caja de agua y una para ambas, proteína y superficie, en una caja de agua. El software utilizado fue NAMD 2.9 con el campo de fuerza INTERFACE v1.5 para la descripción molecular del sistema. Cada dinámica se efectuó simulando un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a 298 K de temperatura y a 1 atm. de presión, aplicando el método *dinámica de Langevin* para la configuración del termostato y el método *Langevin Piston* para la configuración del

baróstato. El *cut-off* escogido para las interacciones de *Lennard-Jones* fue de 12 Å y para calcular las interacciones electrostáticas de largo alcance se consideró el algoritmo *Particle Mesh Ewald*. Todos los sistemas fueron simulados en condiciones periódicas de borde. En el caso de las dinámicas que involucraron la superficie de caolinita, se aplicó una restricción armónica 1 kcal/mol a todos sus átomos con el *script* para VMD *restrainSurface.tcl* (Anexo 6), lo que permitió simular la rigidez del material. Además, se les permitió variar sus dimensiones a lo largo del eje **z**, mientras que se les impuso una relación constante entre los vectores de celda **xy**, tal que representaran las condiciones de la superficie.

La simulación de la superficie fue realizada en 5542000 pasos, equivalentes a 11,084 ns, pues el intervalo de tiempo de integración fue de 2 fs. De ellos, 5532000 pasos (11,064 ns) fueron de producción de la DM. Para el caso de la proteína, la simulación se llevó a cabo en 12722500 pasos (25,445 ns), con 12712500 (25,425 ns) de producción. Finalmente, el modelo que comprende la proteína, la superficie y el agua fue simulado en 5743000 pasos (11,486 ns) con 5733000 pasos de producción (11,466 ns). Cabe señalar que se consideró como producción de la DM al tiempo transcurrido desde que los parámetros termodinámicos de presión y temperatura alcanzaron el equilibrio, según las condiciones propuestas para la simulación. Los Anexos 7, 8 y 9 contienen los archivos de configuración de NAMD utilizados para estas DMs.

4. Presentación, análisis y discusión de los resultados

4.1. Construcción de la superficie de caolinita

El laboratorio de Heinz desarrolló, junto al campo de fuerza INTERFACE, una base de datos con modelos realistas de superficies que consideran propiedades como los defectos, la capacidad de intercambio catiónico (en el caso de los minerales de arcilla), los planos típicos de escisión y el comportamiento en un rango completo de valores de pH. Estas características son esenciales para hacer predicciones adecuadas mediante simulaciones de DM (Heinz et al. n.d.). Cada uno de estos modelos fue diseñado con el software Material Studio de Accelrys y representado en dos archivos: uno con las coordenadas espaciales de todos los átomos (formato .car) y otro que indica la conectividad entre ellos (formato .mdf).

Entre los distintos materiales que ofrece esta base de datos, existen tres modelos diferentes de caolinita basados en su estructura cristalográfica experimental. Una es la celda unitaria en el grupo espacial *C1* (Bish 1993) (Figura 13A); otro es una lámina simple de 5x3x1 celdas unitarias (Figura 13B); y el último es una doble lámina de caolinita de 5x3x2 celdas unitarias. Estudios computacionales previos demuestran que la superficie de un material puede ser representada con confiabilidad mediante modelos de una sola lámina (Croteau et al. 2009; Fang et al. 2005). A partir de estos antecedentes y considerando las dimensiones necesarias que debe tener el sistema para representar el fenómeno de adsorción del IgG1, en el presente trabajo se modeló la superficie de esta forma.

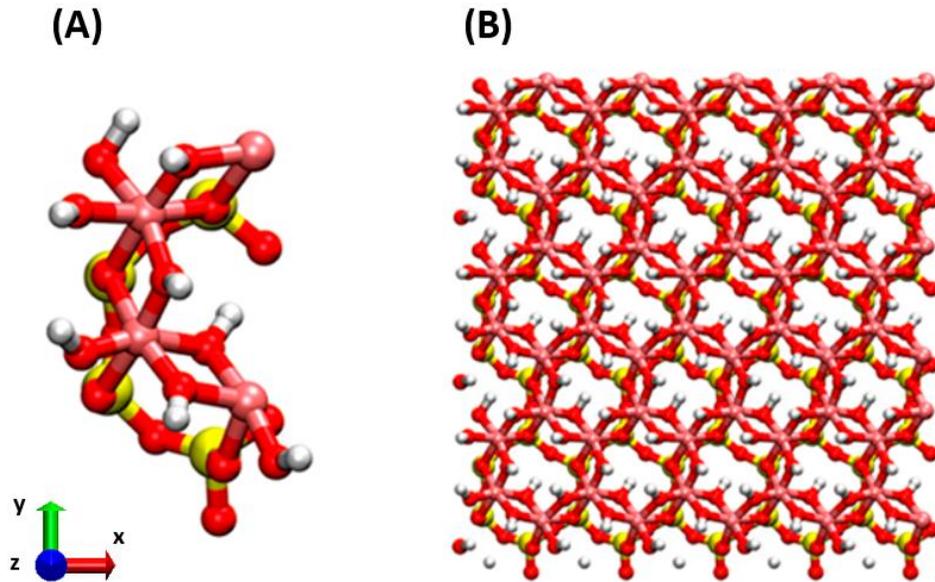


Figura 13. Estructura de la caolinita. (A) Estructura tridimensional de la celda unitaria de caolinita (Bish 1993) (archivos kaolinite_unit_cell.car y kaolinite_unit_cell.mdf) (B) Estructura tridimensional de la lámina simple de caolinita de 5x3x1 celdas unitarias (archivos kaolinite15_single_layer.car y kaolinite15_single_layer.mdf). El color de los átomos sigue la representación señalada en la Figura 5.

4.1.1. Análisis de los archivos de coordenadas cartesianas .car

Un archivo de coordenadas cartesianas .car entrega, junto a otra información, las coordenadas espaciales de todos los átomos que componen un sistema.

El archivo kaolinite_unit_cell.car posee las coordenadas de los átomos de la celda unitaria de caolinita, que son 34 en total: 4 de silicio, 4 de aluminio, 18 de oxígeno y 8 de hidrógeno. Por otro lado, kaolinite15_single_layer.car, almacena la posición de 510 átomos: 60 de silicio, 60 de aluminio, 270 de oxígeno y 120 de hidrógeno, 15 veces más que la celda unitaria.

En el archivo kaolinite15_single_layer.car cada una de las celdas unitarias que compone la superficie está identificada por un número que va del 1 al 15. Al observar las coordenadas en que están ubicados los átomos en el archivo, se pudo ver que cada uno de ellos está a una distancia constante de 5,15 Å con su homólogo de la celda contigua en el eje de las abscisas y a 8,94 Å en el eje de las ordenadas, como era de esperarse, pues este es el tamaño reportado de la celda unitaria (Bish 1993) . Lo anterior se repite para cada tipo de átomo de la lámina excepto para 3, uno de oxígeno y uno de hidrógeno en las celdas 5, 10 y 15 (de ahora en adelante, celdas de borde derecho) y para un átomo de hidrógeno en las celdas 11, 12, 13, 14 y 15 (de ahora en adelante celdas de borde superior). Los pares de átomos de hidrógeno y oxígeno faltantes en las celdas de borde derecho se encuentran desplazados al extremo izquierdo de la lámina ($-x$), con identificadores independientes que van del 16 al 18, mientras que los átomos de hidrógeno que no están presentes en las celdas de borde superior están posicionados en el extremo inferior de la lámina ($-y$) y son identificados con números que van del 19 al 23 (Figura 14). La razón de este desplazamiento se justifica en que los ángulos de cristalización de la caolinita son de $\alpha=91,93^\circ$, $\beta=105,05^\circ$ y de $\gamma=89,8^\circ$ (Bish 1993). Entonces, al realizar la escisión de este material para generar la superficie, se pierden los átomos de las celdas señaladas, pero se reciben los de la celda cortada en el extremo contrario. Se debe dejar en claro que esto ocurre porque los ángulos de cristalización del material no son mutuamente ortogonales y no tiene que ver con defectos en la superficie ni con problemas en su representación.

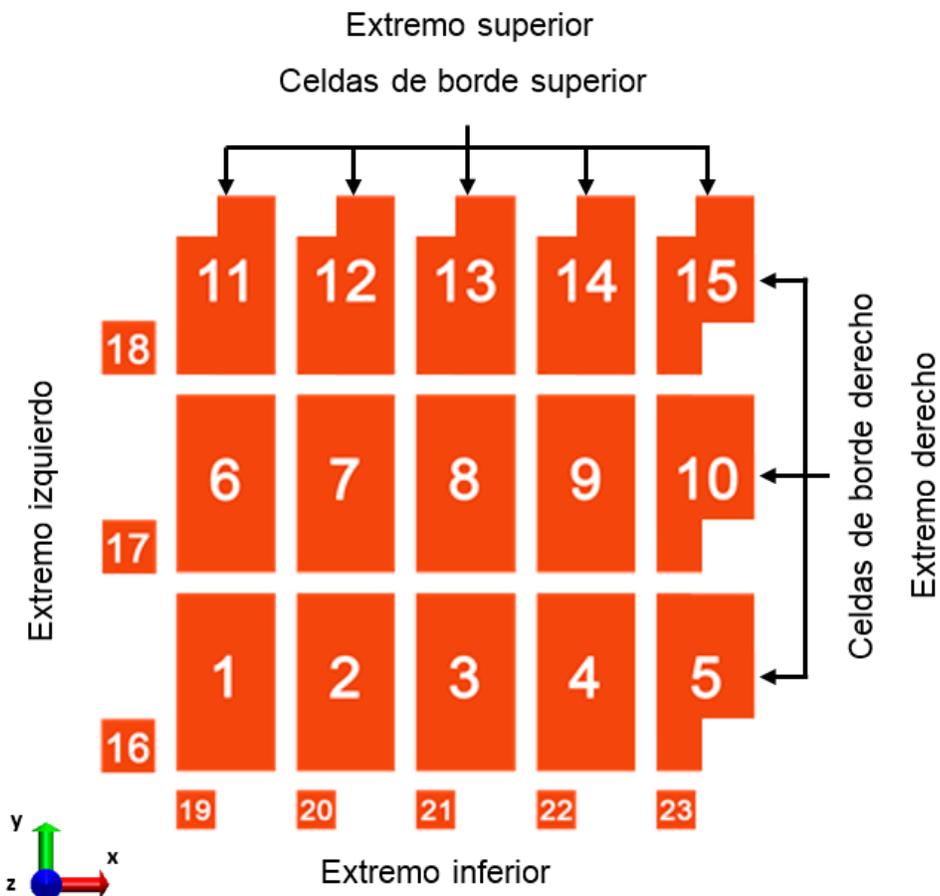


Figura 14. Representación esquemática del archivo kaolinite15_single_layer.car.

4.1.2. Análisis de los archivos de información molecular .mdf

Un archivo de conectividad .mdf posee toda la información necesaria para definir un sistema molecular, a excepción de las coordenadas atómicas. El archivo está separado en tres apartados principales: la sección de topología, la sección de simetría y la sección de configuración atómica, no siendo todas obligatorias si no se necesitan. En el caso de los archivos kaolinite_unit_cell.mdf y kaolinite15_single_layer.mdf solo está definida la sección de topología y la de simetría.

La sección de topología de los .mdf está conformada por 13 columnas sucesivas, cada una de las cuales describe un atributo o propiedad de cada átomo. En orden, las columnas son:

0. Nombre del átomo
1. Elemento químico
2. tipo de átomo en el campo de fuerza
3. nombre del grupo de carga
4. número isotópico del átomo
5. carga formal del átomo
6. carga atómica
7. bandera para átomos intercambiables de grupo
8. bandera para átomos fuera del plano
9. bandera de quiralidad de las conexiones
10. factor de ocupancia parcial
11. factor de temperatura isotrópica del experimento (rayos X)
12. conexiones

La información que entrega cada uno de estos campos es constante para cada átomo del mismo elemento en el sistema, a excepción de las conexiones, las cuales varían de acuerdo a la estructura cristalográfica del compuesto.

En la columna de las conexiones se observan los otros átomos con los que un átomo en particular establece enlaces. Distintas nomenclaturas indican si el átomo al cual se hace referencia como enlazado forma parte de la misma celda u otra distinta.

Debido a que la lámina simple de caolinita está compuesta por réplicas de la celda unitaria, fue posible observar patrones de conexión entre los átomos del archivo kaolinite15_single_layer.car, que se repiten cuando se establecen conexiones con átomos de la misma celda o de celdas contiguas, incluyendo

aquellos enlaces que se producen con átomos de celdas replicadas por condiciones periódicas de borde.

Finalmente, en la sección de simetría de ambos archivos está descrita la periodicidad del sistema en los tres ejes (Accelrys Inc. 2001).

4.1.3. Programación del script kaoliniteSurfGen.pl

Posterior al análisis de los archivos .car y .mdf de la celda unitaria y de la lámina simple, se diseñó el *script* kaoliniteSurfGen_NR.pl, el cual es capaz de generar superficies laminares de cualquier tamaño superior a 2x2 celdas unitarias. Este *script* recibe como entrada el número de celdas que se quieren en el eje de las abscisas y de las ordenadas, y los archivos kaolinite_unit_cell.car y kaolinite_unit_cell.mdf. Como salida genera los archivos kaolinite_ **xxx**yy_NR.car y kaolinite_ **xxx**yy_NR.mdf (NR como sigla de no rectangular), donde **xx** equivale a la cantidad de celdas unitarias pedidas en el eje **x** e **yy** a la cantidad en el eje **y**.

A pesar que las superficies que genera kaoliniteSurfGen_NR.pl son funcionales, resultó más conveniente restituir la posición de los átomos desplazados a la ubicación que les correspondería en las celdas de borde derecho y superior. Esto se hizo para obtener una superficie con vectores mutuamente ortogonales y así prescindir de parámetros que incrementan el tiempo de cómputo, en el archivo configuración de NAMD (Theoretical and Computational Biophysics Group 2003).

Para reubicar los átomos desplazados, se hicieron modificaciones a kaoliniteSurfGen_NR.pl, lo que originó un *script* alternativo al que se denominó kaoliniteSurfGen.pl (Anexo 1), que opera de la misma forma, pero considerando los cambios estructurales mencionados. Así se obtuvo una superficie de caolinita de 38x22x1 celdas unitarias en los archivos kaolinite_38x22_R.car y

kaolinite_38x22_R.mdf (notar el cambio de la terminación NR a R, que quiere decir que la nueva lámina es rectangular). El tamaño, aproximadamente $200 \times 200 \times 5 \text{ \AA}^3$, fue lo suficientemente grande como para estudiar las primeras fases de la adsorción de IgG1.

La construcción de la lámina fue realizada, en primera instancia, simulando las superficies generadas por el software Material Studio de Accelrys, incluyendo el desplazamiento de los átomos al borde superior y derecho. Se hizo de esta forma por la validación exhaustiva que aquellos modelos han recibido por parte de sus autores (Biovia 2016) y por la gran cantidad de investigaciones en las que han sido utilizadas (Raffaini & Ganazzoli 2010; Panos et al. 2012; Ganazzoli & Raffaini 2005). A pesar de las modificaciones que posee, la superficie que generó el *script* kaoliniteSurfGen.pl es igualmente válida.

Por otro lado, solo se consideró una lámina de este material en la construcción del sistema. Aunque diversos estudios sobre adsorción de proteínas muestran modelos similares (Akdin et al. 2013; Croteau et al. 2009; Kubiak-Ossowska & Mulheran 2011), el uso de más de una lámina podría entregar una representación más realista del comportamiento de las moléculas en la interface. A pesar de esto, el método aquí utilizado fue el más adecuado de acuerdo a los recursos computacionales disponibles para esta investigación.

4.2. Análisis de la estabilidad estructural de la superficie de caolinita en una caja de agua

Se estudió la DM de la superficie de caolinita de $200 \times 200 \times 5 \text{ \AA}^3$ en una caja de agua tras 11,1 ns de simulación, para evaluar el comportamiento del campo de fuerza INTERFACE. En el análisis de datos se ocuparon los módulos de VMD *Radial*

Pair Distribution Function $g(r)$ y *RMSD Visualizer Tool* y la información del archivo de registro .log de NAMD.

Durante la etapa de producción de la dinámica se evaluó la temperatura y la presión del sistema. Ambos valores se mantuvieron constantes a lo largo de toda la DM a $T=297,6\pm 0,9$ K (Figura 15) y $P=1,1\pm 8,1$ atm. (Figura 16), tal como se indicó en el ensamble NPT. Para que la presión se mantuviera constante se utilizaron los parámetros *useFlexibleCell* y *useConstantRatio* en el archivo de configuración de NAMD. El primero permitió que el sistema fuera flexible en todas sus coordenadas, mientras que el segundo lo condicionó para que mantuviera una relación constante entre los vectores x e y . Con el análisis anterior se pudo corroborar que los parámetros de presión y temperatura establecidos para la simulación representan el sistema modelado.

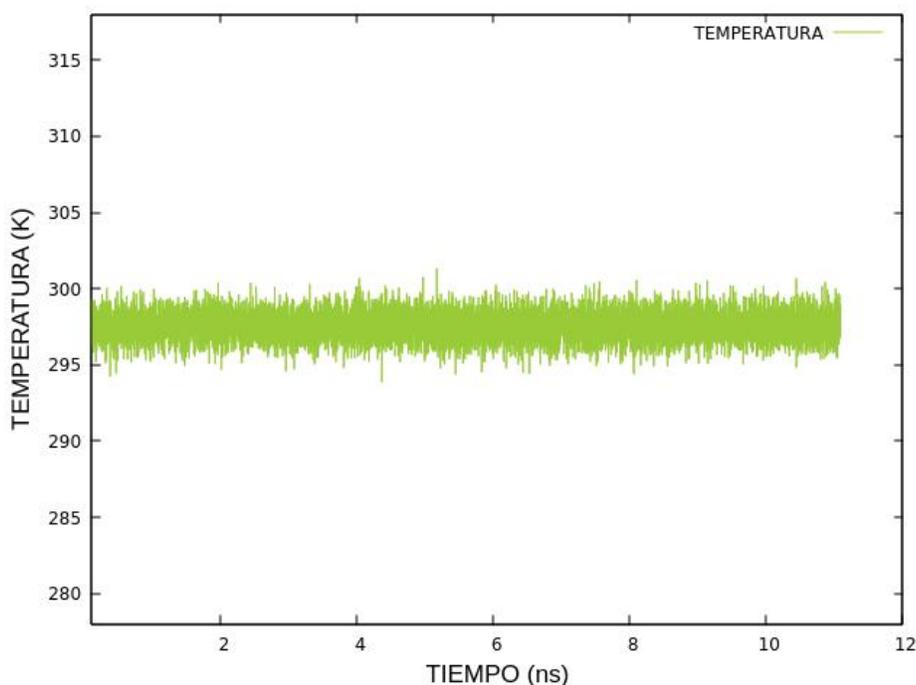


Figura 15. Temperatura del sistema conformado por la superficie en una caja de agua durante 11,1 ns de DM. El valor promedio fue de $297,6\pm 0,9$ K.

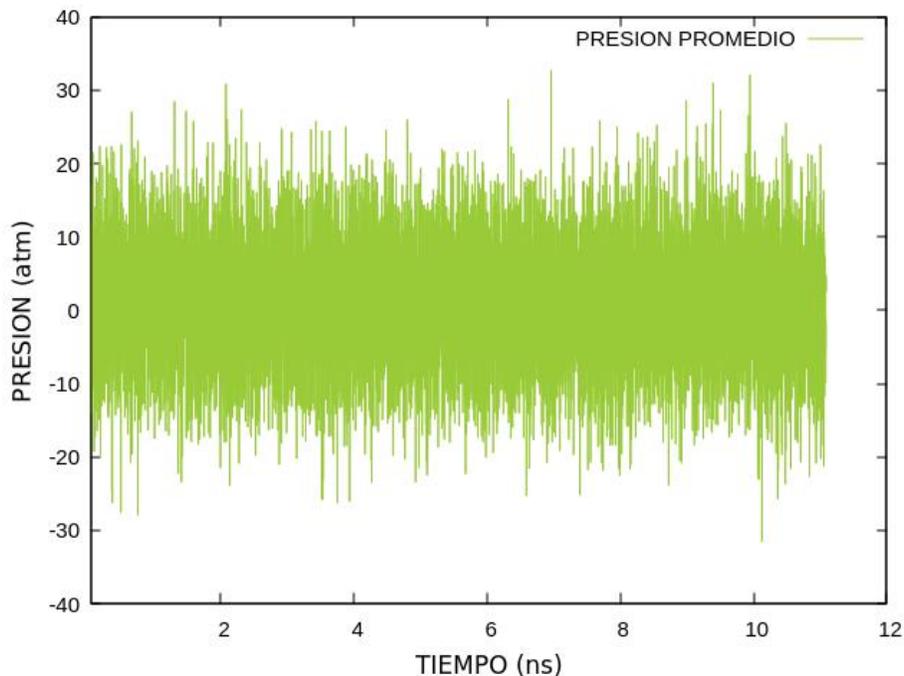


Figura 16. Presión del sistema conformado por la superficie en una caja de agua durante 11,1 ns de DM. El valor promedio fue de $1,1 \pm 8,1$ atm.

La estabilidad de la conformación espacial de la superficie se analizó mediante la raíz cuadrada del desplazamiento cuadrático medio (RMSD, por sus siglas en ingles) de sus átomos durante la simulación. Debido a la restricción de movimiento a cual estuvieron sometidos para simular la rigidez del material, la lámina no experimentó grandes cambios en comparación con la conformación inicial no equilibrada, tal como ocurre en los sólidos cristalinos. Por este motivo la meseta se alcanzó a los $\text{RMSD}=0,325 \text{ \AA}$ en los primeros tiempos de simulación y se mantuvo constante hasta el final de la simulación (Figura 17).

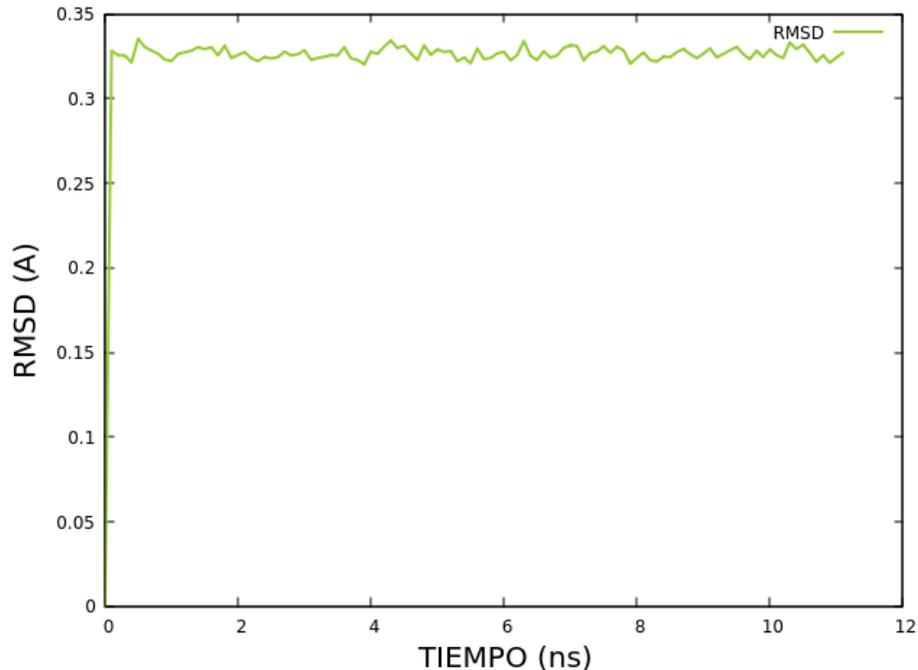


Figura 17. Raíz cuadrada del desplazamiento cuadrático medio (RMSD) de los átomos de la superficie de caolinita, calculada a partir de la trayectoria de la DM. Se utilizó como referencia la estructura de partida de la simulación.

A partir del análisis de la función de distribución radial, fue posible obtener una descripción más detallada del comportamiento de las moléculas de agua sobre la superficie simulada. La función de distribución radial de pares ($g(r)$) describe la variación de la densidad de partículas en función de la distancia ($r+\delta r$) a partir de un punto de referencia. Para el análisis se escogió un valor de cambio de $\delta r=0,1 \text{ \AA}$, explorando un radio máximo de $r_{\text{max}}=10 \text{ \AA}$. La Figura 18 muestra que, como promedio, los átomos de oxígeno de las moléculas de agua se ubicaron a $2,2 \text{ \AA}$ respecto a los átomos de H expuestos al medio de la capa basal de aluminio de la superficie de caolinita, lo que indica que el modelo es capaz de reproducir las propiedades hidrofílicas de esta capa, mediante la formación enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua que se aproximan a ella. La capa basal de la silicio, en cambio, muestra un carácter menos hidrofílico, que era lo esperado por las características de este material (Yin et al. 2012). En este caso, se observa que los

átomos de oxígeno no se encuentran perfectamente ordenados formando la red de enlaces de hidrógenos vista en la capa basal de aluminio.

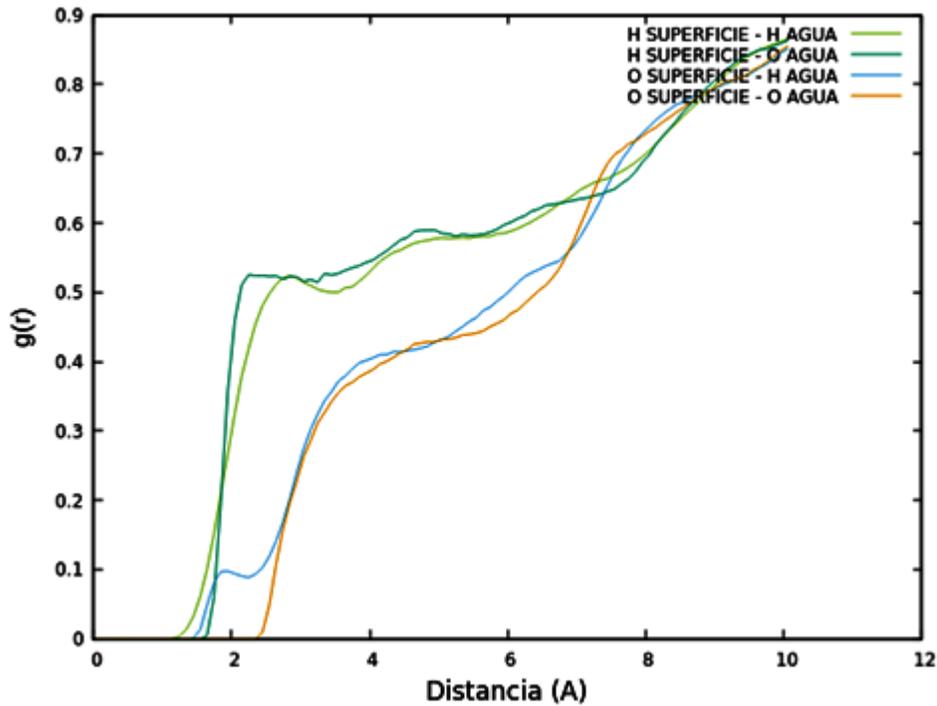


Figura 18. Función de distribución radial de pares entre los hidrógenos expuestos al medio de la capa basal de aluminio y de los oxígenos expuestos al medio de la capa basal de silicio de la caolinita con el agua.

Los resultados expuestos muestran que tanto el modelo estructural como la configuración establecida para la producción de la dinámica representaron adecuadamente el modelo simulado. Esta configuración y resultados obtenidos sirvieron como patrón de comparación para la simulación del proceso de adsorción.

4.3. Reconstrucción de los subdominios de la IgG1

Antes de realizar los estudios de DM, se realizó una reconstrucción de los subdominios de la IgG1 b12, debido a que el archivo .pdb obtenido desde la base de datos Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) posee *gaps* estructurales en las zonas de mayor movilidad de una de sus cadenas pesadas. Estos *gaps* son: siete residuos en la región bisagra, entre la SER127 y la THR137; tres residuos en un *loop* de la subunidad Hc₁ de uno de los dominios Fab, entre la CYS235 y la CYS239; y tres residuos que van desde la SER475 hasta el extremo C-terminal de la cadena (Figura 19) (Saphire et al. 2001).

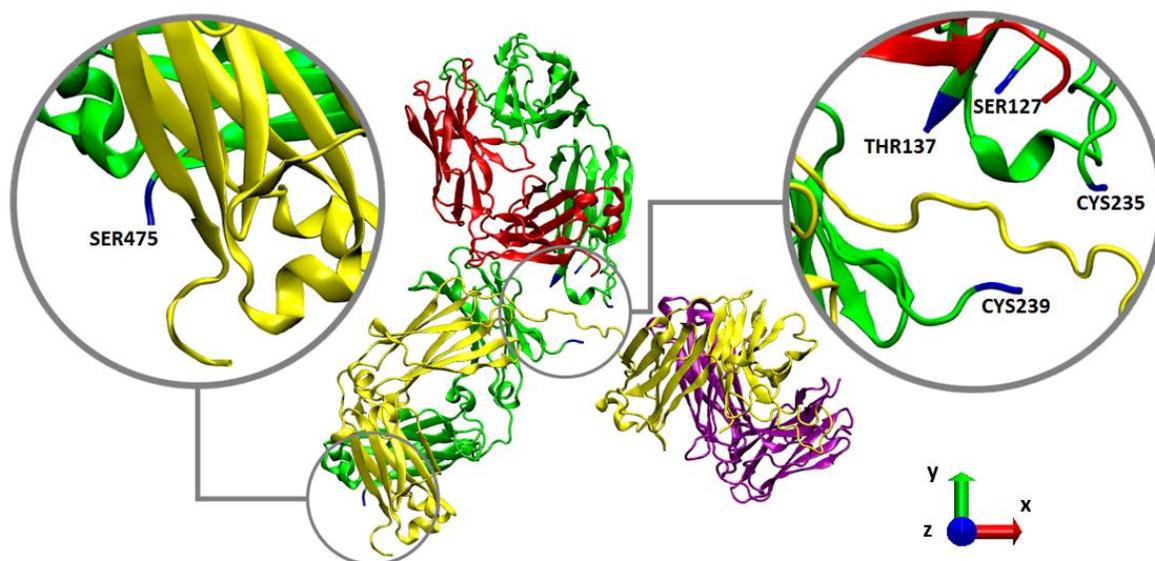


Figura 19. Representación de la estructura cristalográfica de la IgG1 b12 humana intacta (código PDB: 1HZH). El *zoom* corresponde a las regiones en las que existen *gaps* estructurales en la cadena pesada K (color verde): siete residuos en la región bisagra, entre la SER127 y la THR137; tres residuos en un *loop* uno de los dominios Fab, entre la CYS235 y la CYS239; y tres residuos que van desde la SER475 hasta el extremo C-terminal de la cadena. Los colores de las cadenas siguen lo señalado en la Figura 6, mientras que el azul muestra los residuos anterior y posterior a cada *gap*.

La reconstrucción se llevó a cabo mediante un modelamiento por homología con el software Modeller v.9.16 entre la secuencia aminoacídica de la IgG1 b12, conocida para este anticuerpo, y su propia estructura tridimensional incompleta, como molde. La búsqueda condujo a 5 posibles resultados (archivos de coordenadas .pdb), desde donde se eligió el que poseía un menor número de restricciones espaciales (*molpdf*), equivalente a 8163,27. La elección se hizo siguiendo lo sugerido en el tutorial del software disponible en su sitio oficial (Andrej 2010). El archivo generado fue nombrado 1HZH_M.pdb (Figura 20). En este procedimiento, además, se eliminaron las moléculas de agua y las cadenas de carbohidratos cristalizadas con la proteína. La decisión de eliminar los N-glicanos se fundamentó en que diversos estudios experimentales de adsorción de proteínas mediante AFM muestran que los volúmenes moleculares de los anticuerpos corresponden a lo esperado para sus pesos moleculares, basándose en sus secuencias aminoacídicas (Barrera et al. 2008; Barrera et al. 2005).

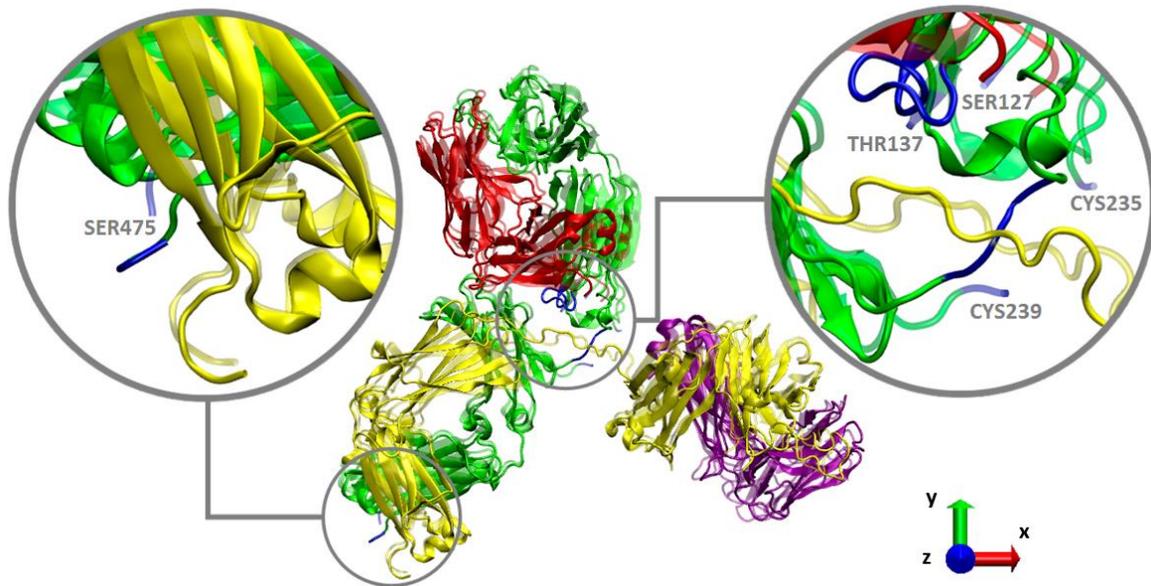


Figura 20. Representaciones tridimensionales comparadas de la estructura de la proteína 1HZH (transparente) y su modelo por homología de menor molpdf, al que se denominó 1HZH_M (opaco). Los colores de las cadenas siguen lo señalado en la Figura 6, mientras que el azul muestra los residuos anterior y posterior a cada *gap* en el modelo 1HZH y los residuos reconstruidos en el modelo 1HZH_M.

4.4. Análisis de la estabilidad estructural de la IgG1 en una caja de agua

De la misma forma en que se hizo para la superficie de caolinita y con el objetivo de establecer un patrón de comparación para el modelo de adsorción deseado, se realizó una DM de la IgG1 en una caja de agua. Nuevamente se utilizó el campo de fuerza INTERFACE y se obtuvo una producción dinámica del sistema de 25,4 ns. Las Figuras 21 y 22 muestran como el ensamble simulado reproduce los datos termodinámicos de temperatura y presión deseados para el modelo.

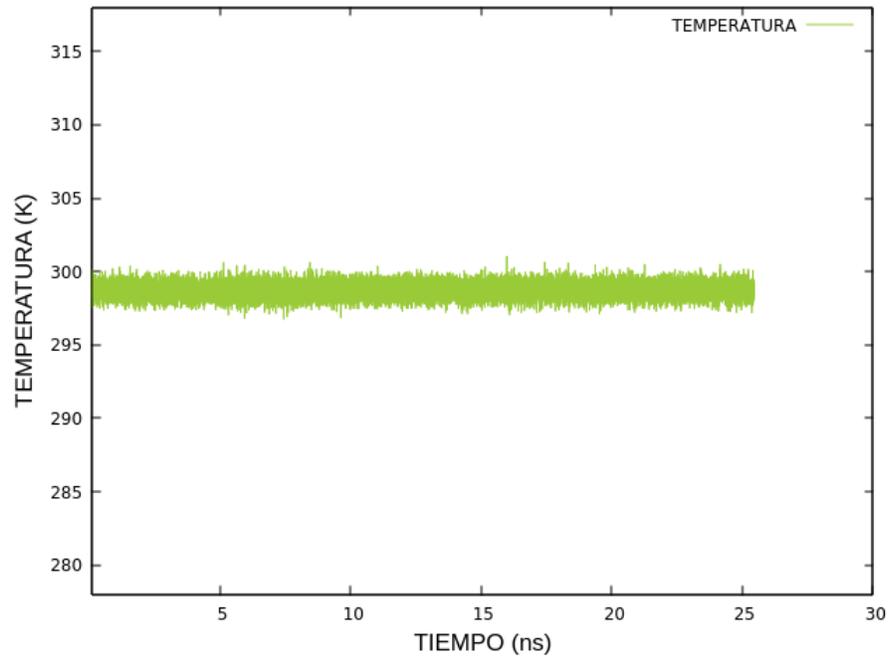


Figura 21. Temperatura del sistema conformado por la IgG1 en una caja de agua durante 25,4 ns de DM. El valor promedio fue de $298,7 \pm 0,5$ K.

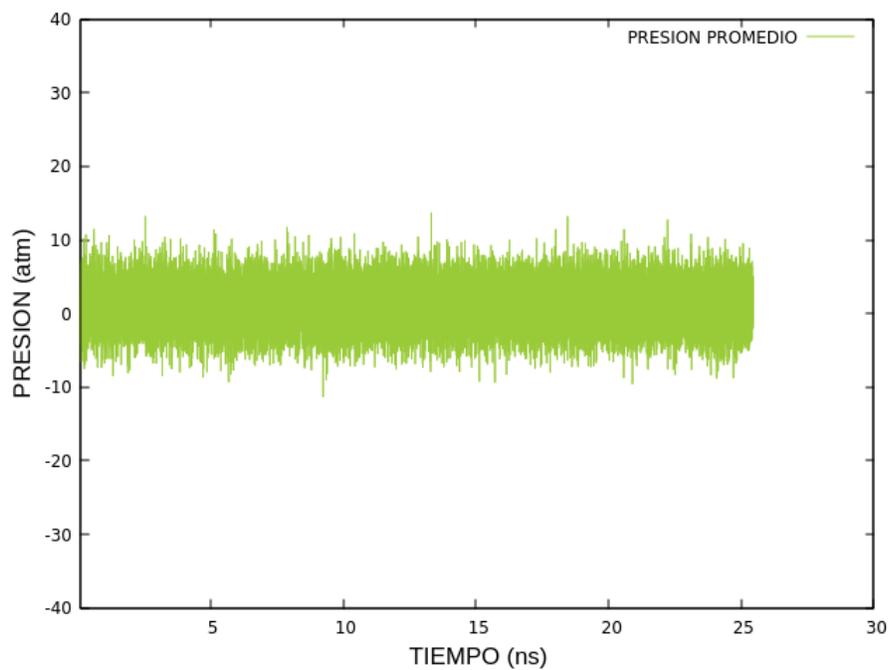


Figura 22. Presión promedio del sistema conformado por la IgG1 en una caja de agua durante 25,4 ns de DM. El valor promedio fue de $1,0 \pm 2,9$ atm.

Por otro lado, el análisis de RMSD de la proteína reveló que los dominios individuales Fab y Fc tienden a permanecer en conformaciones muy estables, como puede apreciarse en la Figura 23. En todos los casos se consideró las coordenadas iniciales como referencia. En cambio, la región bisagra posee una alta flexibilidad, tal como muestra el RMSD del sistema completo representado en la misma figura. Esta región experimenta movimientos muy amplios durante toda la dinámica, de acuerdo a lo esperado, ya que son regiones que no presentan estructura secundaria y se encuentran más expuestas al solvente. El alto valor de RMSD para la proteína completa, alcanzado después de un largo tiempo de simulación (zona de meseta), muestra la flexibilidad conformacional de esta proteína de forma similar a lo reportado en investigaciones anteriores (Brandt et al. 2010). Estudios experimentales recientes han demostrado que para representar adecuadamente la dinámica estructural de este anticuerpo se requiere considerar muchos vectores que representen la localización de cada dominio respecto a los otros, debido a las fluctuaciones que permite la región bisagra (Zhang et al. 2015).

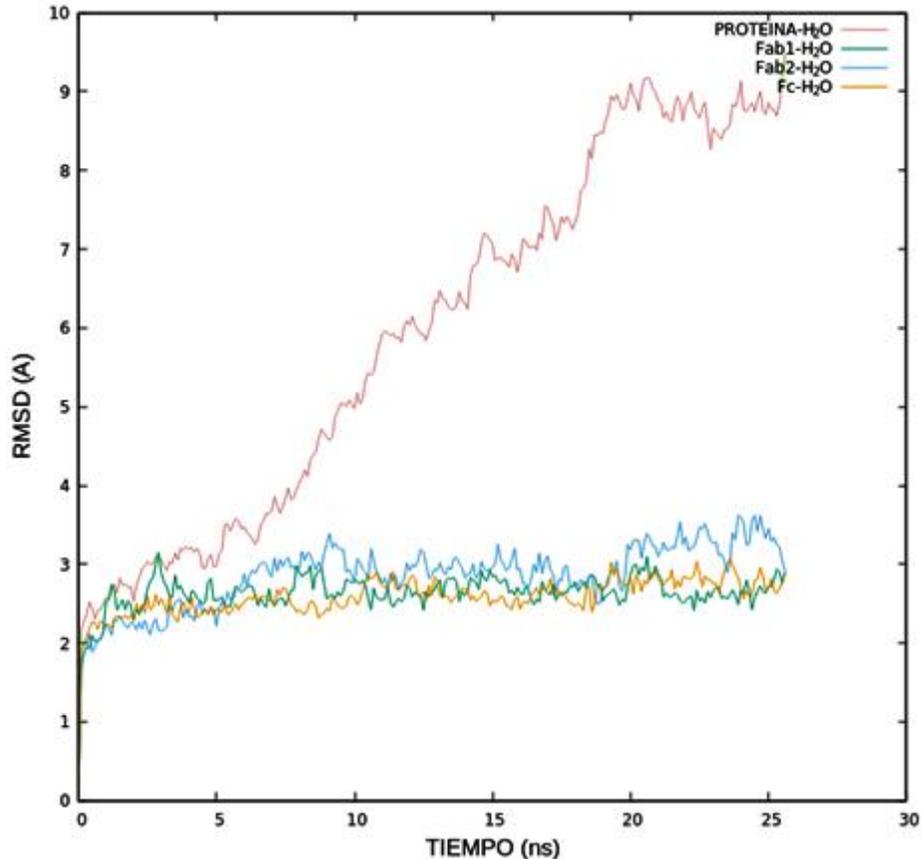


Figura 23. RMSD de los átomos de la proteína, calculada a partir de la trayectoria de la DM. Se utilizó como referencia la estructura de partida de la simulación.

4.5. Determinación de la orientación inicial de la IgG1 sobre la superficie de caolinita

Uno de los factores más relevantes en el proceso de adsorción, es la orientación rotacional que posee el adsorbato al aproximarse a la superficie sólida. En el caso de la adsorción de proteínas, la orientación determina cuáles serán los primeros dominios y residuos que entrarán en contacto con el adsorbente. Esto tiene implicancia directa en la forma en que la proteína se despliega sobre la superficie, el tiempo que demorará en hacerlo e incluso en la reversibilidad del proceso

(Javkhlantugs & Bayar 2013). En investigaciones previas de adsorción de proteínas *in silico*, una de las estrategias más utilizadas para describir el proceso de adsorción fue la creación de un conjunto de modelos con distintas orientaciones rotacionales iniciales, los cuales, en conjunto, permitieron dilucidar aquellas fuerzas que contribuyeron o inhibieron la interacción con la superficie (Raffaini & Ganazzoli 2003; Raffaini & Ganazzoli 2004; Raffaini & Ganazzoli 2006b; Kubiak-Ossowska & Mulheran 2010). A pesar que esta metodología entrega una descripción detallada de los factores involucrados en la difusión de la proteína sobre la superficie, presenta como contraparte su alto costo computacional, por lo que es difícil de implementar en modelos con moléculas de gran tamaño y con tantos grados de libertad como el que aquí se presenta. Por lo anterior, para determinar la orientación inicial que tuvo la IgG1 sobre la superficie de caolinita, se construyó el *script* `proteinInitialPosition.tcl`. Este encontró la posición que promueve la mayor cantidad de interacciones atractivas entre ambas, mediante una serie de parámetros definidos por el usuario.

Los parámetros que `proteinInitialPosition.tcl` recibió como entrada fueron: el nombre de los archivo de coordenadas `.pdb` que contenían la proteína y la superficie luego de 10 ns de simulación (`1HZH_M_RU_MD.pdb` y `kaolinite_38x22_MD.pdb`, respectivamente), el ángulo que indica la cantidad de grados en que se harían las rotaciones en la proteína (15°), una distancia *cut-off* para las interacciones electrostáticas y de van der Waals (12 \AA , al igual que en el archivo de configuración de NAMD), la distancia a la cual quedaría la proteína de la superficie después de determinar la orientación inicial (2 \AA), una serie de residuos que fueron definidos como favorables para la interacción (SER, THR, GLN, ASN y TYR), y una serie de ellos que se determinaron como desfavorables (ALA, CYS, VAL LEU, ILE, MET, PRO, PHE, TRP y GLY). Estos residuos fueron elegidos teniendo en cuenta la baja hidrofobicidad de la capa basal de aluminio de la caolinita, que fue la escogida como adsorbente.

El *script* comenzó contando la cantidad átomos de oxígeno y de nitrógeno de las cadenas laterales de los residuos favorables y los carbonos α de los residuos

desfavorables que existían desde el menor valor en **z** de la proteína, 10 Å hacia su centro. Esto corresponde a la diferencia entre el *cut-off* y la distancia a la que se posicionaría la proteína de la superficie después de encontrar la orientación más afín. Luego, se substrajo la cantidad de átomos favorables (4 átomos), de los desfavorables (1 átomo) y de esta forma se estableció la afinidad como 3. A continuación, se le aplicó una rotación de 15° en torno al eje **x** y luego la misma cantidad en torno al eje **y** y al eje **z**. En esta nueva orientación se volvió a calcular la afinidad y se comparó con la anterior. Como fue mayor (9 vs. 3), se desechó la orientación antigua y se conservó la última. De esta forma se siguieron aplicando rotaciones sucesivas en torno al eje **z** de 15° en 15° hasta alcanzar los 360°. Luego, se aplicó una vez más una rotación de 15° en torno al eje **y** y se repitió el procedimiento en **z**. Esto se hizo hasta alcanzar la vuelta completa en eje **x**, contando la afinidad en cada orientación. Cuando se encontraron dos valores de afinidad iguales, se conservó aquella orientación donde la dimensión en **z** de la proteína fue menor, es decir, aquella que tendría los residuos más cercanos a la superficie. De esta forma el *script* determinó que la rotación más favorable se conseguía en los ángulos de rotación $\alpha_x=255^\circ$, $\alpha_y=360^\circ$ y $\alpha_z=15^\circ$. Finalmente, el `proteinInitialPosition.tcl` leyó las dimensiones de la superficie, trasladó la proteína 2 Å por encima su capa basal de aluminio, alineó sus centros geométricos, y generó el archivo `1HZH_M_RU_MD_IP.pdb`, con las nuevas coordenadas atómicas de la proteína (Figura 24).

Rotación en x (°)	Rotación en y (°)	Rotación en z (°)	N° átomos favorables	N° de átomos desfavorables	Afinidad	Dimensión de la proteína en el eje z (Å)
0	0	0	4	1	3	170,75
15	15	15	13	4	9	162,54
15	30	15	19	8	11	145,81
15	105	15	26	11	15	125,50

15	120	15	21	5	16	138,27
30	30	15	24	7	17	143,62
30	105	15	27	9	18	121,86
60	195	15	34	15	19	131,52
75	180	15	37	15	22	116,77
255	360	15	37	15	22	116,76

Tabla 1. Resumen de las orientaciones rotacionales de máxima afinidad para la IgG1 (archivo: 1HZH_M_RU_MD.pdb) al actuar como adsorbato sobre la capa basal de aluminio de la caolinita. Estas fueron halladas con el *script* proteinInitialPosition.tcl cuando el ángulo de exploración fue de 15°, el *cut-off* fue de 12 Å y la distancia proteína-superficie fue de 2 Å.

En el archivo de registro .log generado por proteinInitialPosition.tcl es posible encontrar un resumen de todas las orientaciones que se determinaron como favorables, con los ángulos de rotación en cada eje, la afinidad y el tamaño en **z**, además de una lista con los átomos considerados y la distancia a la que quedarían de la superficie. La Tabla 2 muestra la lista de átomos para los ángulos de rotación $\alpha_x=255^\circ$, $\alpha_y=360^\circ$ y $\alpha_z=15^\circ$.

Se debe señalar que el ángulo de exploración fue escogido considerando la alta demanda de RAM que exige el *script* proteinInitialPosition.tcl, el cual comparó 13824 orientaciones distintas para la proteína antes de elegir la más óptima. Un equipo con mayor cantidad de RAM que el presentado en la sección Materiales y Metodología podría trabajar con un ángulo de exploración menor a 15°, lo cual permitiría obtener un resultado más refinado de las orientaciones más favorables para estudiar el fenómeno de adsorción. Además, se destaca que proteinInitialPosition.tcl puede ser usado también con otras superficies y/u otras proteínas, mediante la utilización del mismo o nuevos criterios de afinidad.

átomos favorables	Distancia hasta la superficie (Å)	átomos desfavorables	Distancia hasta la superficie (Å)
GLN3:OE1	7,97	VAL2:CA	6,45
GLN3:NE2	6,00	ALA24:CA	7,80
GLN3:OE1	9,81	GLY26:CA	2,24
GLN3:NE2	9,67	PHE29:CA	7,61
SER25:OG	4,94	ALA76:CA	5,58
TYR27:OH	8,56	PRO101:CA	9,81
SER30:OG	4,43	TRP104:CA	8,09
ASN31:OD1	4,88	ILE263:CA	8,17
ASN31:ND2	5,99	GLY395:CA	4,52
TYR54:OH	3,17	GLY430:CA	5,56
THR74:OG1	7,78	VAL432:CA	7,06
SER75:OG	3,83	LEU453:CA	9,30
ASN77:OD1	6,02	PRO455:CA	5,22
ASN77:ND2	4,58	GLY456:CA	5,99
SER103:OG	6,74	GLY972:CA	8,07
SER264:OG	7,14		
SER393:OG	8,13		
ASN394:OD1	3,52		
ASN394:ND2	4,09		
GLN396:OE1	5,25		
GLN396:NE2	5,32		
GLN428:OE1	9,26		
GLN429:OE1	2,78		
GLN429:NE2	4,10		
ASN431:OD1	5,06		
ASN431:NE2	6,66		
SER434:OG	9,31		
ASN444:OD1	3,95		
ASN444:ND2	3,60		

TYR446:OH	4,90
GLN448:OE1	6,76
GLN448:NE2	8,57
SER450:OG	6,72
SER452:OG	6,58
SER971:OG	8,09

Tabla 2. Lista de los átomos que favorecen y que desfavorecen la interacción con la capa basal de aluminio de la caolinita, para los ángulos $\alpha_x=255^\circ$, $\alpha_y=360^\circ$ y $\alpha_z=15^\circ$.

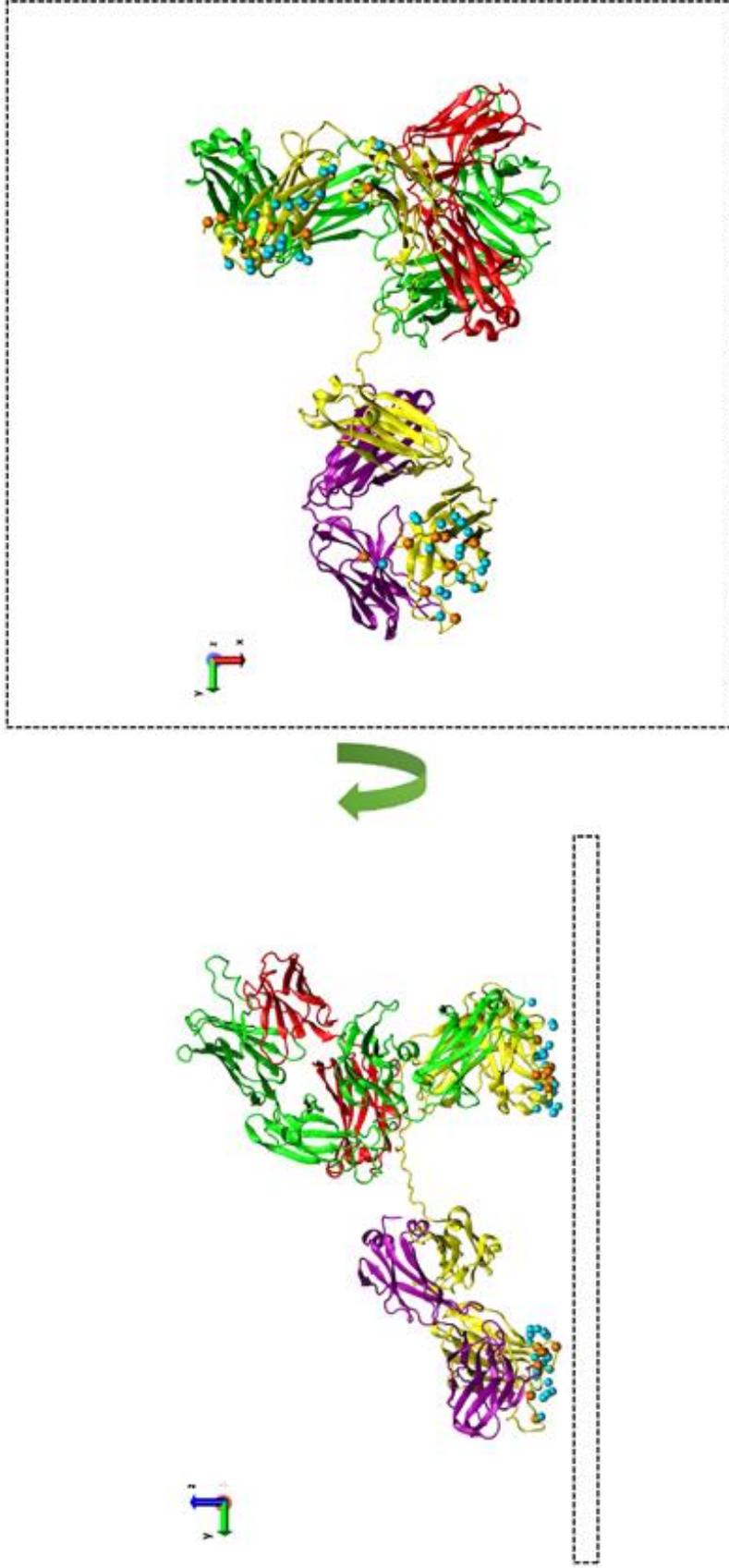


Figura 24. Estructura de la IgG1 en su orientación rotacional más favorable para la adsorción sobre la superficie de caolinita. Los colores de las cadenas siguen la representación señalada en la Figura 6. Las esferas cian representan los átomos de nitrógeno y de oxígeno de los residuos considerados favorables y las esferas naranjas los Ca de los residuos considerados desfavorables. La línea punteada señala la posición que ocuparía posteriormente la superficie.

4.6. Análisis de la estabilidad estructural y de los sitios de interacción de la IgG1 con la superficie de caolinita

Luego de 11,446 ns de producción de la DM, se analizó la temperatura y la presión del sistema (Figuras 25 y 26), para evaluar el comportamiento del campo de fuerza INTERFACE en un sistema con la presencia de átomos de naturaleza orgánica e inorgánica. Como se puede observar, ambos parámetros termodinámicos permanecieron constantes, reproduciendo las condiciones configuradas para la simulación. Al igual que el modelo de la superficie en agua, se utilizaron los parámetros *useFlexibleCell* y *useConstantRatio* para mantener la presión estable.

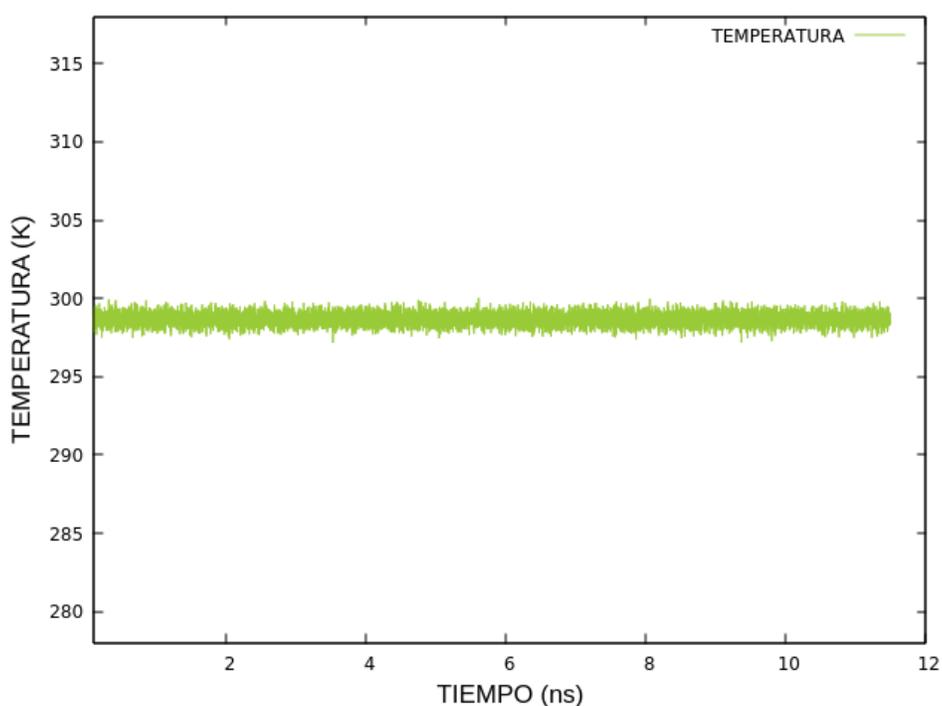


Figura 25. Temperatura del sistema conformado por la IgG1 y la superficie de caolinita en una caja de agua durante 11,446 ns de DM. El valor promedio fue de $298,7 \pm 0,4$ K.

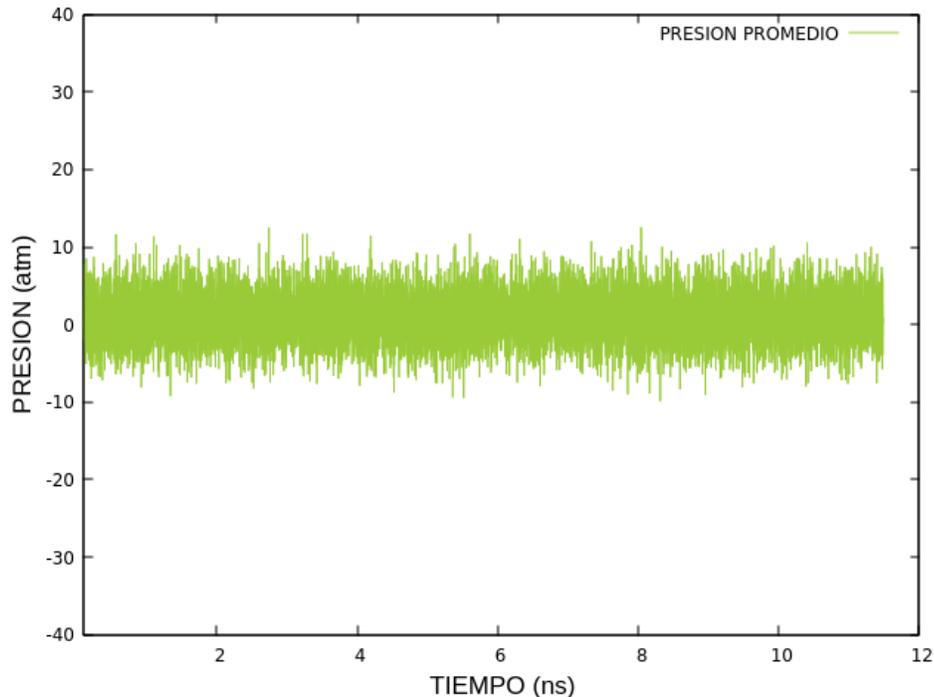


Figura 26. Presión promedio del sistema conformado por la proteína y la superficie en una caja de agua durante 11,446 ns de DM. El valor promedio fue de $1,0 \pm 3,1$ atm.

El análisis RMSD (Figura 27) revela que, al igual que en el sistema que incluye solamente la IgG1 en agua, los dominios Fab y Fc son menos móviles que la proteína como un todo, debido a la alta movilidad de la región bisagra. A pesar de que el tiempo de simulación de este modelo no fue lo suficientemente largo como para alcanzar a evidenciar una meseta en el RMSD de la proteína completa, se puede observar que sigue una tendencia similar a la vista en el sistema que no incluye la superficie.

Para conocer el comportamiento de la IgG1 en la interface, se construyeron dos histogramas de frecuencia de las distancias entre los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilos superficiales de la caolinita y los átomos de oxígeno y nitrógeno presentes en las cadenas laterales de los residuos favorables. Un enlace de hidrógeno se define como $X-H \cdots Y$, siendo X el átomo donador (para este caso, los

oxígenos de los grupos hidroxilos expuestos al medio de la capa basal de aluminio), e Y el aceptor (los oxígenos y nitrógenos de los residuos Fab2 y Fc, en este modelo). Las distancias típicas donor-aceptor oscilan en el rango de los 2,2-3,5 Å. Mientras más cercanos estén ambos átomos (valores más próximos a 2,2 Å), más fuerte es la interacción; por el contrario, mientras más lejos estén (valores más próximos a 3,5 Å) más débil es la naturaleza estabilizante de la misma (Desiraju & Steiner 1999; Kwan 2009). Como en el caso aquí expuesto las distancias fueron medidas respecto al hidrógeno del grupo hidroxilo y no al oxígeno (distancia H...Y), se debe restar lo que mide el enlace covalente, aproximadamente 1,1 Å. De esta forma, en cada histograma se considera que los residuos que predominantemente estabilizan la interacción entre el dominio al cual pertenecen (Fab2 o Fc) y la superficie, son aquellos cuya frecuencia es más alta entre los 1,1 y 2,4 Å (rango representado por el rectángulo de color gris). La frecuencia es medida como la cantidad de *frames* en los cuales un átomo particular se posicionó a una distancia determinada de la lámina de caolinita, de un total de 116 (debido a que se utilizó un *stride*=100 para analizar la DM). Finalmente, la distancia fue discretizada en 20 intervalos comprendidos entre la distancia mínima y máxima que alcanzó cada átomo respecto a los hidrógenos del grupo hidroxilo.

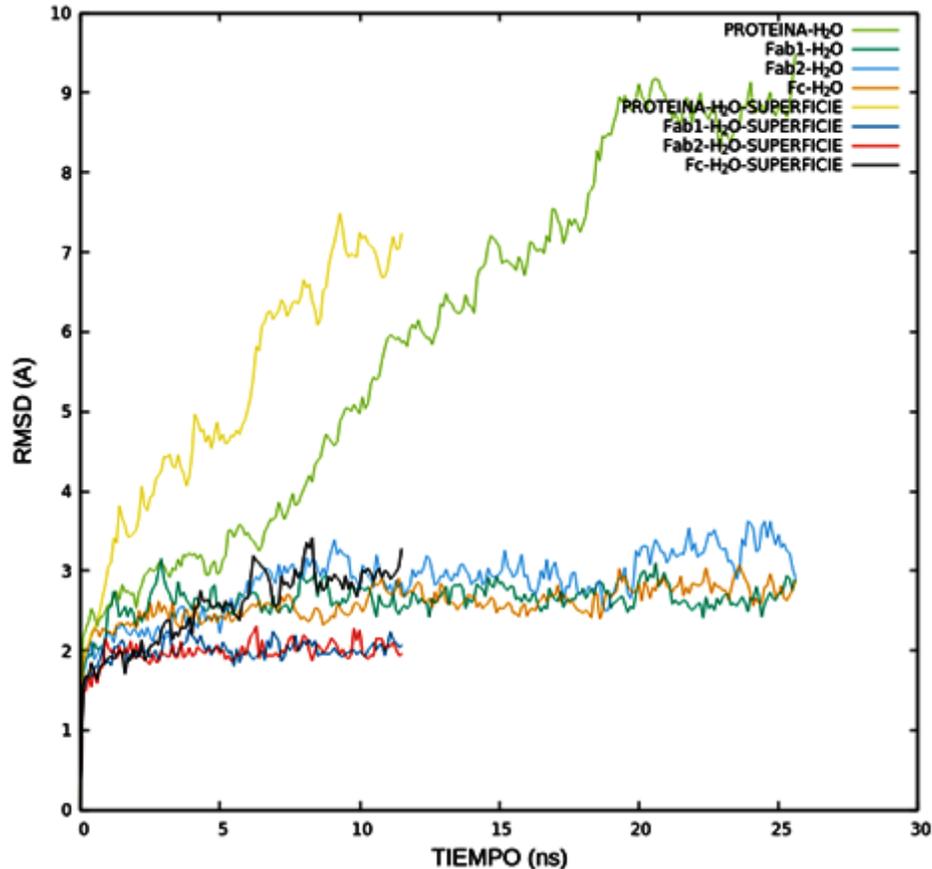


Figura 27. RMSD comparado de los átomos de la proteína en agua, en presencia y ausencia de la superficie de caolinita.

En el caso de las interacciones entre el dominio Fc con la superficie de caolinita (Figura 28), se observaron dos residuos que establecieron enlaces por puente de hidrógeno con la superficie: la ASN444 cuyos átomos aceptores fueron el oxígeno y el nitrógeno de su cadena lateral; y la HIS443, mediante los dos nitrógenos de su cadena lateral. Por otro lado, el dominio Fab2 fue capaz de formar una mayor cantidad de enlaces. En la Figura 29 se puede observar que predominaron las interacciones estabilizantes de 4 residuos durante el estado de equilibrio estudiado: la TYR54; la SER75; la THR74; y la ARG28. Este último establece enlaces con los 3 nitrógenos de su cadena lateral. De los 6 residuos, 4 fueron mencionados en la lista de residuos que favorecen la interacción proteína-superficie entregada por el *script* proteinInitialPosition.tcl, descrito en la sección previa, lo cual sustenta la hipótesis

que señala que la información teórica sobre las propiedades del adsorbato y del adsorbente puede ser utilizada como un criterio para determinar la orientación inicial de una molécula que se adsorberá sobre una superficie. Por último, en el caso de los residuos que tienen más de un átomo aceptor, la frecuencia de ambos en la zona de interés revela detalles de la orientación espacial más favorable para la formación de los enlaces de hidrógeno. La Figura 30 muestra una representación tridimensional detallada de la trayectoria que siguieron estos 6 residuos a lo largo de la DM.

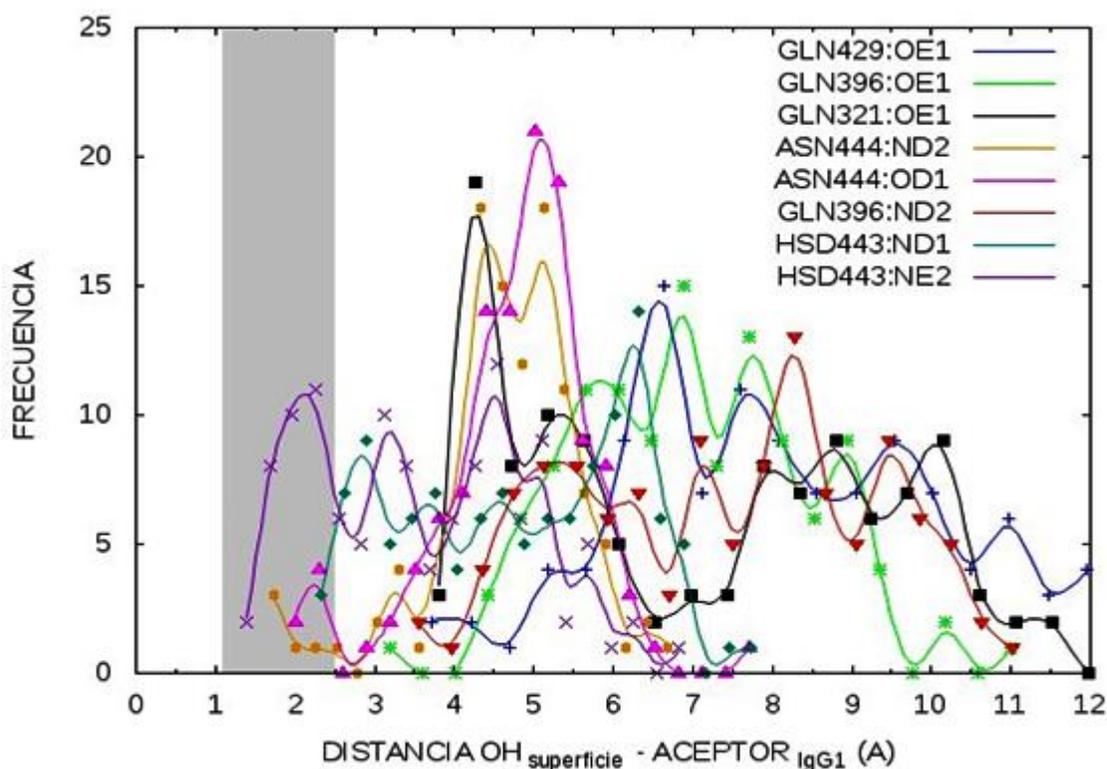


Figura 28. Histograma de frecuencia de las distancias entre el hidrógeno de la capa basal de aluminio de la superficie (donor del enlace de hidrógeno) y oxígeno o nitrógeno (aceptor del enlace de hidrógeno) de los residuos más cercanos a la superficie del dominio Fc. El cuadro gris representa las distancias entre las cuales se pueden formar enlaces de hidrógeno.

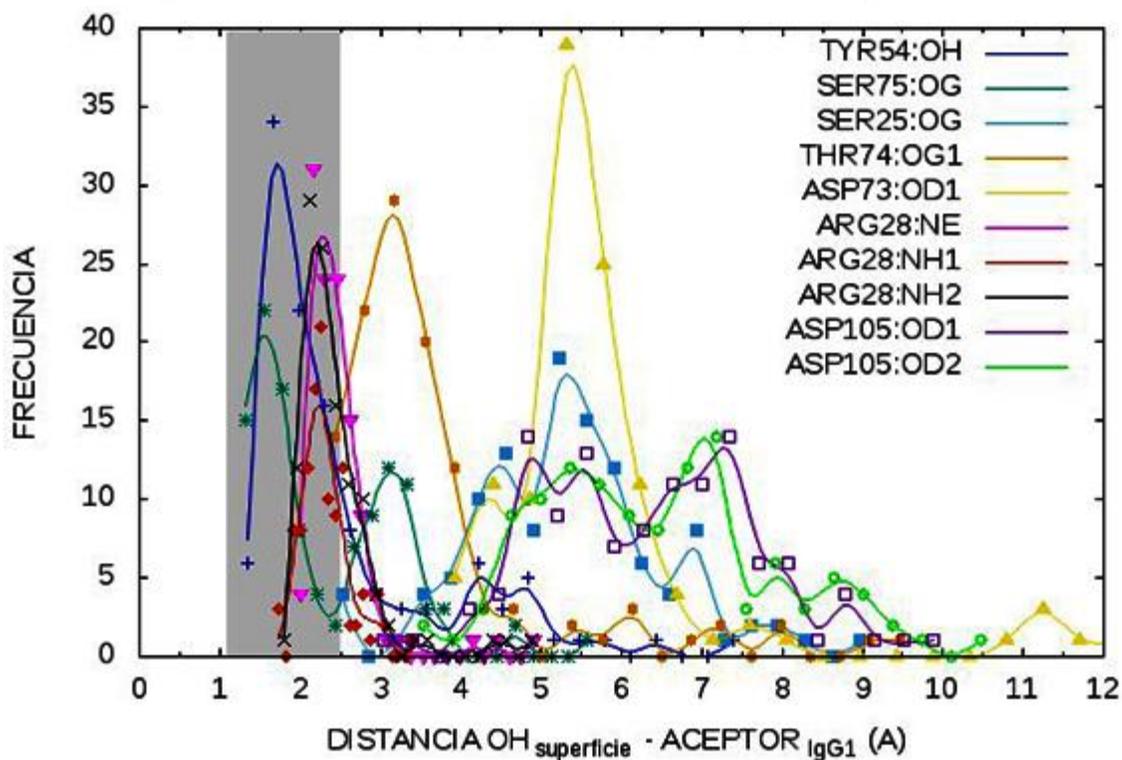


Figura 29. Histograma de frecuencia de las distancias entre el hidrógeno de la capa basal de aluminio de la superficie (donor del enlace de hidrógeno) y oxígeno o nitrógeno (aceptor del enlace de hidrógeno) de los residuos más cercanos a la superficie del dominio Fab2. El cuadro gris representa las distancias entre las cuales se pueden formar enlaces de hidrógeno.

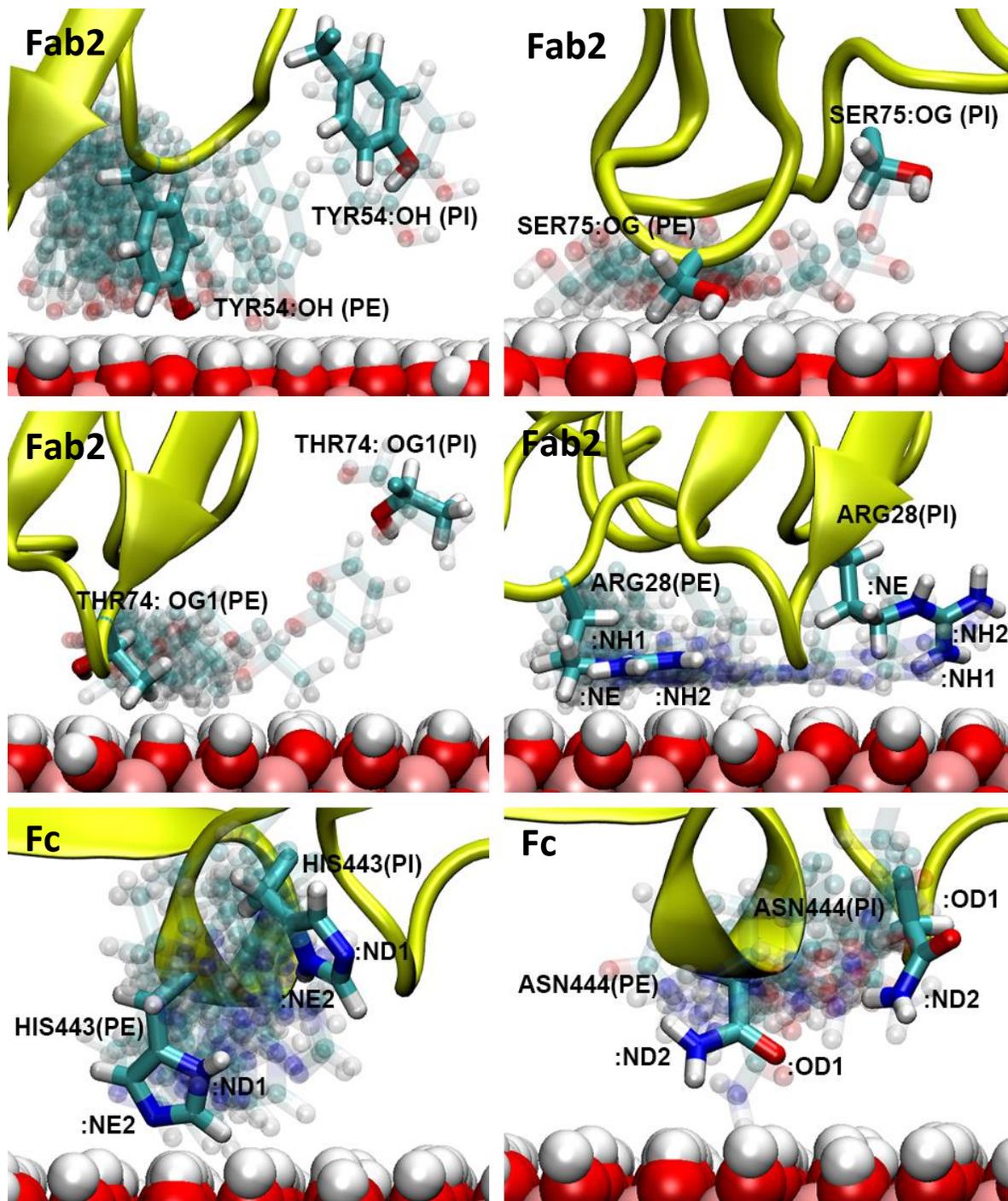
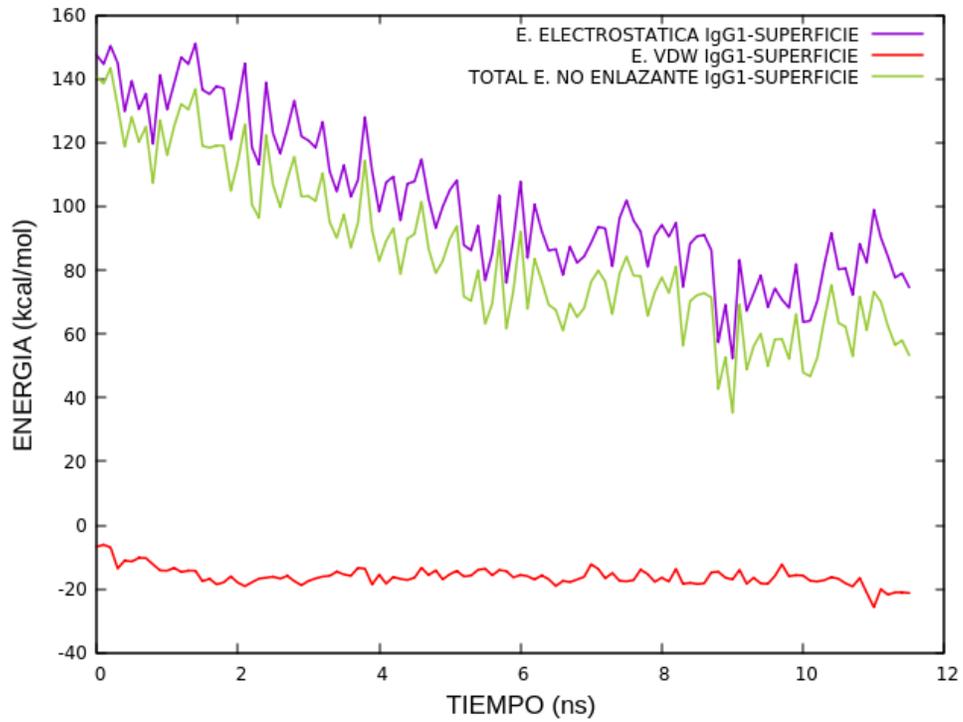


Figura 30. Representación tridimensional del desplazamiento de los residuos de la IgG1 que formaron enlaces de hidrógeno con la superficie de caolinita. Las abreviaciones (PI) y (PE) significan posición de inicio y posición de enlace, respectivamente.

Por último, se hizo un análisis energético de las interacciones no enlazantes entre la IgG1 y la superficie de caolinita, para evaluar las contribuciones individuales de cada una de ellas durante la producción de la DM. En la Figura 31 se observa que, al comienzo de la dinámica molecular, la energía electrostática fue positiva, debido a que la orientación y la posición de la proteína fueron escogidas arbitrariamente, en una conformación artificial alejada del equilibrio. Luego, comenzó a disminuir, lo cual puede ser atribuido a la formación de los enlaces de hidrógenos entre los residuos más cercanos a la superficie y los oxígenos del grupo hidroxilo de la superficie. Los enlaces de hidrógeno del tipo $O-H\cdots N$ y $O-H\cdots O$ tienen una energía que circunda alrededor de las 5-7 kcal/mol (Desiraju & Steiner 1999; Kwan 2009), por lo que la disminución de la energía observada es correspondiente con lo expuesto en el análisis anterior. Las Interacciones proteína-superficie por diferencia de carga no fueron estudiadas en este análisis, pues el pH al cual se realizó la simulación corresponde al PZC de la capa basal de aluminio (Liu 2015). Por otro lado, la energía asociada a las interacciones de van der Waals se mantuvo constante, lo que indica que no hubo variación en este tipo de interacciones. Aunque el tiempo de producción de la DM fue demasiado corto como para sacar conclusiones significativas respecto al comportamiento de la IgG1 en la interface, la disminución de la energía total de las interacciones no enlazantes entre la proteína y la superficie (resultante de la suma de las energías electrostáticas y de van der Waals), muestra indicios de que el sistema avanza hacia un estado de equilibrio.

Una alternativa para validar el protocolo de simulación desarrollado en esta investigación es la aplicación del mismo procedimiento en otros sistemas de menor complejidad, conformados por proteínas y superficies de los cuales ya se tenga conocimiento del proceso completo de adsorción. De esta forma, los resultados previos servirían como patrón de comparación para probar el correcto desempeño de esta metodología, sin las limitaciones que aquí se observaron asociadas al tiempo máximo de producción de las dinámicas moleculares.



Figura

31. Energías de las interacciones no enlazantes del sistema conformado por la IgG1 y la superficie de caolinita en una caja de agua.

5. Conclusiones

Luego de finalizada la investigación y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se concluye que:

- ♦ Se construyó el *script* kaoliniteSurfGen.pl, el cual genera superficies de caolinita de cualquier tamaño adaptadas para el software NAMD. Estas superficies consideran propiedades como los defectos, la capacidad de intercambio catiónico y el comportamiento de la lámina en un rango completo de valores de pH.
- ♦ Se construyó un modelo que permite reproducir el comportamiento de una superficie de caolinita en un medio acuoso, usando la técnica de DM, teniendo en consideración la rigidez y las vibraciones características de los sólidos cristalinos, así como la hidrofobicidad de las capas basales que la componen.
- ♦ Se determinó la estructura tridimensional de la IgG1, usando la técnica de modelamiento por homología, a partir de su modelo cristalográfico incompleto disponible en la base de datos Protein Data Bank.
- ♦ Se construyó un modelo que permite reproducir el comportamiento de la IgG1 en una caja de agua. En él se observó la alta movilidad que le otorga la región bisagra a los anticuerpos.
- ♦ Se construyó el *script* para VMD proteinInitialPosition.tcl, el cual utilizó información teórica para determinar la orientación más favorable de adsorción de la IgG1 sobre la capa basal de aluminio de la caolinita. Este método permite realizar una exploración más completa del espacio de interacción durante la dinámica molecular, como una alternativa al uso

de muchas estructuras de partida, lo que conlleva un alto costo computacional.

- ♦ Las primeras fases del proceso de adsorción de la IgG1 sobre la capa basal de aluminio de la caolinita son mediadas por los puentes de hidrógeno formados entre los residuos más cercanos a la superficie y los oxígenos del grupo hidroxilo que esta capa expone al medio.

6. Proyecciones futuras

Diversos estudios de adsorción de sobre superficies sólidas muestran metodologías alternativas para simular el comportamiento de las proteínas en interface. La sección Estudios Computaciones Sobre Adsorción de Proteínas, en el Marco Teórico de esta tesis, sugiere dos técnicas que podrían complementar lo expuesto en los resultados de esta investigación, para conocer en mayor detalle los factores involucrados en la adsorción de la IgG1 sobre una superficie de caolinita. Las dinámicas moleculares *coarse-grained* han sido utilizadas ampliamente para estimar el plegado y desplegado de proteínas sobre superficies sólidas, mediante la elaboración de modelos menos complejos que los utilizados en DM. La elaboración de estos modelos permite tiempos más prolongados de simulación, del orden de los milisegundos (Heinz et al. 2013), lo cual es ideal para sistemas de gran tamaño como el que aquí se construyó. Por otro lado, el uso de dinámica molecular acelerada en este modelo permitiría explorar una mayor cantidad de estados de fases del sistema, permitiendo salir de la escala de los nanosegundos mediante la adición de energía de forma artificial para escapar de mínimos de energía potencial (Mücksch & Urbassek 2013).

Finalmente, la realización de estudios experimentales utilizando AFM permitiría obtener un punto de comparación realista del proceso de adsorción completo de la IgG1 sobre la caolinita, lo cual serviría para la elaboración de nuevas técnicas y protocolos *in silico* orientados de forma más específica a la comprensión de este fenómeno.

7. Referencias

- Accelrys Inc., 2001. Common File Formats. Available at: http://www.ifm.liu.se/compchem/msi/doc/life/insight2K/formats980/File_Formats_1998.html#484514 [Accessed August 5, 2016].
- Aisenbrey, C., Bechinger, B. & Gröbner, G., 2008. Macromolecular Crowding at Membrane Interfaces: Adsorption and Alignment of Membrane Peptides. *Journal of Molecular Biology*, 375(2), pp.376–385.
- Akdim, B. et al., 2013. Electronic properties of a graphene device with peptide adsorption: Insight from simulation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(15), pp.7470–7477.
- Andrej, S., 2010. Modeling with cryo-EM. Available at: <https://salilab.org/modeller/tutorial/cryoem/assess.html> [Accessed September 22, 2016].
- Barrera, N.P. et al., 2005. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), pp.10759–10765.
- Barrera, N.P., Henderson, R.M. & Edwardson, J.M., 2008. Determination of the architecture of ionotropic receptors using AFM imaging. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 456(1), pp.199–209.
- Bhattacharyya, K.G. & Gupta, S. Sen, 2008. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140(2), pp.114–131.
- Biovia, 2016. BIOVIA Materials Studio | Material Modeling & Simulation Software Application. Available at: <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-materials-studio/> [Accessed June 22, 2016].
- Bish, D.L., 1993. Rietveld refinement of the kaolinite structure at 1.5 K. *Clays and Clay Minerals*, 41(6), pp.738–744.
- Brandt, J.P., Patapoff, T.W. & Aragon, S.R., 2010. Construction, MD simulation, and hydrodynamic validation of an all-atom model of a monoclonal IgG antibody. *Biophysical Journal*, 99(3), pp.905–913. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.05.003>.
- de Castro, C.E. et al., 2014. Understanding the structural parameters of biocompatible nanoparticles dictating protein fouling. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 30(32), pp.9770–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25068509>.
- Croteau, T., Bertram, A.K. & Patey, G.N., 2009. Simulation of water adsorption on kaolinite under atmospheric conditions. *The Journal of Physical Chemistry A*,

113(27), pp.7826–33. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514713>.

- Desiraju, G.R. & Steiner, T., 1999. *The Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology*. Oxford University Press, OXFORD,.
- Dominguez, R. & Holmes, K.C., 2011. Antibody structure and function. *Focus*, 40(1), pp.58–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314430>.
- Eswar, N. et al., 2007. *Comparative protein structure modeling using MODELLER*, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429317>.
- Fang, Q., Huang, S. & Wang, W., 2005. Intercalation of dimethyl sulphoxide in kaolinite: Molecular dynamics simulation study. *Chemical Physics Letters*, 411(1–3), pp.233–237.
- Ganazzoli, F. & Raffaini, G., 2005. Computer simulation of polypeptide adsorption on model biomaterials. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 7(21), pp.3651–3663.
- Garofalini, S.H., 1990. Molecular dynamics computer simulations of silica surface structure and adsorption of water molecules. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 120(1–3), pp.1–12.
- Gray, J.J., 2004. The interaction of proteins with solid surfaces. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(1), pp.110–115.
- Gupta, V. et al., 2011. Particle interactions in kaolinite suspensions and corresponding aggregate structures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 359(1), pp.95–103. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.043>.
- Gupta, V. & Miller, J.D., 2010. Surface force measurements at the basal planes of ordered kaolinite particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 344(2), pp.362–371. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.012>.
- Heinz, H. et al., DESIGNING BIOLOGICAL AND NANOSTRUCTURED MATERIALS. Available at: <https://bionanostructures.com/interface-md/> [Accessed September 20, 2016].
- Heinz, H. et al., 2013. Thermodynamically consistent force fields for the assembly of inorganic, organic, and biological nanostructures: the INTERFACE force field. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 29(6), pp.1754–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23276161>.
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K., 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), pp.33–38.
- Javkhlantugs, N. & Bayar, H., 2013. Computational study on the interactions and orientation of monoclonal human immunoglobulin G on a polystyrene surface. *International Journal of Nanomedicine*, pp.2487–2496. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3713897/> [Accessed September 2, 2014].

- Kretzschmar, R., Holthoff, H. & Sticher, H., 1998. Influence of pH and Humic Acid on Coagulation Kinetics of Kaolinite: A Dynamic Light Scattering Study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 202(1), pp.95–103.
- Kubiak-Ossowska, K. & Mulheran, P. a., 2011. Multiprotein interactions during surface adsorption: A molecular dynamics study of lysozyme aggregation at a charged solid surface. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(28), pp.8891–8900.
- Kubiak-Ossowska, K. & Mulheran, P. a., 2010. What governs protein adsorption and immobilization at a charged solid surface? *Langmuir*, 26(11), pp.7690–7694.
- Kwan, E., 2009. *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Available at: http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/smnr_2009_Kwan_Eugene.pdf [Accessed September 26, 2016].
- Liu, H. & May, K., 2012. Disulfide bond structures of IgG molecules. *mAbs*, 4(1), pp.17–23. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/mabs.4.1.18347>.
- Liu, J., 2015. *Surface Properties of Kaolinite Particles - Their Interactions and Flotation Considerations*. The University of Utah.
- Malmsten, M., Muller, D. & Lassen, B., 1997. Sequential Adsorption of Human Serum Albumin (HSA), Immunoglobulin G (IgG), and Fibrinogen (Fgn) at HMDSO Plasma Polymer Surfaces. *Journal of colloid and interface science*, 193(1), pp.88–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9299092>.
- Mathé, C. et al., 2013. Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface. *PloS one*, 8(11), p.e81346. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3839912&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 14, 2014].
- Meulenbroek, A., 2008. Useful Diagnostic Markers for Immunocompetence. *Hman IgG subclasses: usefuls diagnostic markers for immunocompetence*, p.6.
- Mijajlovic, M., Penna, M.J. & Biggs, M.J., 2013. Free energy of adsorption for a peptide at a liquid/solid interface via nonequilibrium molecular dynamics. *Langmuir*, 29(9), pp.2919–2926.
- Mücksch, C. & Urbassek, H.M., 2013. Enhancing protein adsorption simulations by using accelerated molecular dynamics. *PloS one*, 8(6), p.e64883. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3670854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 24, 2014].
- Mücksch, C. & Urbassek, H.M., 2011. Molecular dynamics simulation of free and forced BSA adsorption on a hydrophobic graphite surface. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 27(21), pp.12938–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21877733>.
- Nakanishi, K. et al., 2001. REVIEW On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon. , 91(3), pp.233–244.

- Nel, A.E. et al., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7), pp.543–557. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2442>.
- Nollert, P., Kiefer, H. & Jähnig, F., 1995. Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces. *Biophysical journal*, 69(4), pp.1447–1455.
- Norde, W., 1996. Driving forces for protein adsorption at solid surfaces. *Macromolecular Symposia*, 103(1), pp.5–18. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/masy.19961030104/abstract\npapers2:/publication/doi/10.1002/masy.19961030104>.
- Norde, W., 2008. My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(1), pp.1–9.
- Norde, W. & Giacomelli, C.E., 2000. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *Journal of Biotechnology*, 79(3), pp.259–268.
- Ortega-Vinuesa, J.L., Galvez-Ruiz, M.J. & Hidalgo-Alvarez, R., 1995. Molecular interactions at biointerfaces: A study of lipid adsorption. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6(12), pp.754–761.
- Panos, M., Sen, T.Z. & Ahunbay, M.G., 2012. Molecular simulation of fibronectin adsorption onto polyurethane surfaces. *Langmuir*, 28(34), pp.12619–12628.
- Penna, M.J., Mijajlovic, M. & Biggs, M.J., 2014. Molecular-level understanding of protein adsorption at the interface between water and a strongly interacting uncharged solid surface. *Journal of the American Chemical Society*, 136(14), pp.5323–5331.
- Phillips, J.C. et al., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), pp.1781–1802.
- Pickett, S.D. et al., 1990. Mobility of adsorbed species in zeolites: a molecular dynamics simulation of xenon in silicalite. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(4), pp.1233–1236. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100367a010>.
- Rabe, M., Verdes, D. & Seeger, S., 2011. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162(1–2), pp.87–106. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.007>.
- Raffaini, G. & Ganazzoli, F., 2006a. Adsorption of charged albumin subdomains on a graphite surface. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 76(3), pp.638–645.
- Raffaini, G. & Ganazzoli, F., 2004. Molecular dynamics simulation of the adsorption of a fibronectin module on a graphite surface. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 20(8), pp.3371–3378.
- Raffaini, G. & Ganazzoli, F., 2010. Molecular Modeling of Protein Adsorption at

- Biointerfaces: Surface Modification and Nanostructure for Smart Biomaterials. *Smart Bio-Materials and Drug Delivery*, (Md), pp.1–4.
- Raffaini, G. & Ganazzoli, F., 2006b. Protein adsorption on the hydrophilic surface of a glassy polymer: a computer simulation study. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 8(23), pp.2765–2772.
- Raffaini, G. & Ganazzoli, F., 2003. Simulation study of the interaction of some albumin subdomains with a flat graphite surface. *Langmuir*, 19(8), pp.3403–3412.
- Rand, B. & Melton, I.E., 1975. Isoelectric point of the edge of kaolinite. *Nature Publishing Group*, 253. Available at: <http://www.nature.com.proxy1.lib.uwo.ca/nature/journal/v253/n5486/pdf/253009a0.pdf>.
- Saphire, E.O. et al., 2001. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), pp.1155–1159.
- Stadlmann, J. et al., 2008. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics*, 8(14), pp.2858–2871.
- Talbot, J., Tildesley, D.J. & Steele, W.A., 1984. A molecular dynamics simulation of nitrogen adsorbed on graphite. *Molecular Physics*, 51(6), pp.1331–1356.
- Theoretical and Computational Biophysics Group, 2003. NAMD Wiki: NamdTroubleshooting. Available at: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/wiki/index.cgi?NamdTroubleshooting> [Accessed September 5, 2016].
- Thermo Scientific, P., 2010. Antibody Production and Purification Technical Handbook. , pp.1–77. Available at: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/1601975-Antibody-Production-Purification-Guide.pdf> [Accessed August 9, 2016].
- Tim, C. et al., 2012. NAMD Tutorial-Unix / MacOSX Version. , (February).
- Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), pp.1–17.
- Wei, Q. et al., 2014. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(31), pp.8004–8031.
- Wei, S. & Knotts, T. a, 2013. A coarse grain model for protein-surface interactions. *The Journal of chemical physics*, 139(9), p.95102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24028132> [Accessed August 13, 2014].
- Wei, T., Carignano, M. a. & Szleifer, I., 2011. Lysozyme adsorption on polyethylene surfaces: Why are long simulations needed? *Langmuir*, 27(19), pp.12074–12081.
- Yin, X. et al., 2012. Surface charge and wetting characteristics of layered silicate minerals. *Advances in Colloid and Interface Science*, 179–182, pp.43–50. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2012.06.004>.

- Yu, C., 2000. Molecular dynamics simulations of the adsorption of proteins on clay mineral surfaces. *Journal of Molecular Structure*, 556(1–3), pp.95–103. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286000006554>.
- Yu, C. & Lansing, E., 2000. Molecular dynamics simulations of the adsorption of methylene blue at clay mineral surfaces. , 48(6), pp.665–681.
- Yu, C.H. et al., 2000. Molecular dynamics simulations of the adsorption of proteins on clay mineral surfaces. *Journal of Molecular Structure*, 556(1–3), pp.95–103. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286000006554>.
- Zhang, X. et al., 2015. 3D Structural Fluctuation of IgG1 Antibody Revealed by Individual Particle Electron Tomography. *Scientific Reports*, 5, p.9803. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4419541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.nature.com/articles/srep09803>.

8. Anexos

8.1. Anexo 1: *Script* kaoliniteSurfGen.pl

```
#####  
# kaoliniteSurfGen.pl #  
# -----#  
# Este script en Perl replica la celda unitaria de caolinita #  
# (Bish, 1993), para generar una lámina de este material de cualquier #  
# tamaño mayor a 2x2 (idénticas a las creadas por el software Material #  
# Studio de Accelrys). Para lograrlo, hace copias sucesivas de los #  
# átomos de la celda unitaria en el espacio y luego los conecta entre #  
# ellos. #  
# #  
# Entradas: #  
# - Archivo .car (posición atómica) de la celda unitaria #  
# - archivo .mdf (estructura molecular) de la celda unitaria #  
# - Tamaño de la lámina en el eje x #  
# - Tamaño de la lámina en el eje y #  
# - Decisión de obtener una superficie rectangular #  
# #  
# Salidas: #  
# - Archivo .car de la lámina pedida #  
# - Archivo .mdf de la lámina pedida #  
# #  
#####  
  
#!/usr/bin/perl -w  
  
# Entradas:  
if(1){  
    $unitCellFile = "UC"; # Nombre de la celda unitaria de caolinita  
    (.car y .mdf deben tener el mismo nombre)  
    $tamX = 30; # Tamaño de la lámina en el eje x, expresado en  
    Angstroms.  
    $tamY = 30; # Tamaño de la lámina en el eje y, expresado en  
    Angstroms.  
    $rectangular = "yes"; # "yes" para una superficie rectangular, "no" para  
    una superficie con átomos desplazados  
}  
  
# Fijación de constantes y variables iniciales.  
$unitCellX=int($tamX/5.13217738); # Celdas unitarias en x.  
$unitCellY=int($tamY/8.90593483333); # Celdas unitarias en y.  
$date=localtime();  
$column=0;  
  
# La replicación de los átomos se realizará con x=5.13217738 A e  
y=8.90593483333 A de separación. Esto es debido a que a pesar de que la  
celda es más grande en ambos ejes, se superponen al momento de ensamblar la  
superficie, haciendo que el espacio ocupado por la lámina sea menor que si  
se posicionaran la misma cantidad de celdas unitarias de forma contigua.
```

```

# Apertura, lectura y cierre de los archivos de entrada.
unless ((open (FILEREADCAR,$unitCellFile.".car")) and (open (FILEREADMDF,$unitCellFile.".mdf"))){
  if ($rectangular eq "yes"){
    open (LOG, "> kaolinite_".$unitCellX."x".$unitCellY."_R.log");
  }
  else{
    open (LOG, "> kaolinite_".$unitCellX."x".$unitCellY."_NR.log");
  }
  printf LOG "Problemas para abrir el archivo. Compruebe que el archivo
existe y que el nombre ingresado sea correcto\n\n";
  close (LOG);
  exit;
}
@unitCellCar=<FILEREADCAR>;
@unitCellMdf=<FILEREADMDF>;
close FILEREADCAR;
close FILEREADMDF;

#####
#   DISEÑANDO EL ARCHIVO .CAR                                     #
#####

# Para manejar los datos del archivo .car de la celda unitaria, cada
columna de este se almacena en su propio arreglo.
for ($numAtom=0;$numAtom<34;$numAtom++){
  @line=split /\s+/, $unitCellCar[$numAtom+5];
  push(@atomName,$line[$column]);
  push(@xCor,$line[$column+1]);
  push(@yCor,$line[$column+2]);
  push(@zCor,$line[$column+3]);
  push(@resType,$line[$column+4]);
  push(@aux,$line[$column+5]);
  push(@potType,$line[$column+6]);
  push(@elementSym,$line[$column+7]);
  push(@partialCharge,$line[$column+8]);
}

# Para entender los comentarios posteriores, imaginar que la superficie
crece en dirección +x y +y. De esta forma, "inferior" significa en
dirección -y, "superior" significa en dirección +y, "izquierda" significa
en dirección -x y "derecha" significa en dirección +x.

# Se distinguen tres tipos de celdas unitarias en las superficies laminares
que son generada por el software Material Studio de Accelrys: 1) Las celdas
"comunes", que son replicas idénticas de la celda unitaria pero desplazadas
en el espacio; 2) Las celdas "de borde derecho", que son similares a la
celda unitaria, excepto porque carecen de los átomos O12 y H2, los que se
encuentran ubicados en el extremo izquierdo de la lámina; y 3) Las celdas
"de borde superior" que carece del átomo H1, que se posiciona en el extremo
inferior de la superficie. (La celda de la esquina superior derecha está
falta de 3 átomos). Este desplazamiento de algunos átomos al extremo puesto
de su posición original tiene relación con los ángulos de cristalización de
la caolinita, que no son ortogonales a los ejes.

```

Antes de escribir las filas de texto que representan cada átomo en el archivo de salida .car, este script calcula la información de cada uno de ellos y la almacena en distintos arreglos, de acuerdo al tipo de átomo que se esté tratando.

#Se crean tres arreglos: uno para almacenar la información de los átomos comunes, que son los que mantendrán su posición correspondiente en el espacio, tal como si se hiciera una copia idéntica de la celda unitaria; otro para la información de los átomos desplazados hasta el extremo izquierdo de la superficie; y otro para la información de los átomos desplazados al extremo inferior.

```
$cell=1;
$despXAd=0;
```

```
# Mientras no se hayan construido todas las celdas unitarias en el eje y...
for($despY=0;$despY<$unitCelly;$despY++){
  if($despY>0){
    # (Este es un desplazamiento relacionado con los angulos de
    # cristalización que Material Studio agrega a cada nueva
    # fila de celdas que construye a lo largo del eje y)
    $despXAd=$despXAd+0.031213405;
  }
  # ...y mientras no se hayan construido todas las celdas en el eje x...
  for($despX=0;$despX<$unitCellX;$despX++){
    # para cada nuevo átomo, evaluar:
    for($numAtom=0;$numAtom<34;$numAtom++){
      # Si la celda en construcción es del tipo común...
      if($despX<$unitCellX-1 and $despY<$unitCelly-1){
        # ..guarda la información de sus átomos en el arreglo @comAtom.
        push(@comAtom,$atomName[$numAtom]);
        push(@comAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd);
        push(@comAtom,$yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY);
        push(@comAtom,$zCor[$numAtom]);
        push(@comAtom,$resType[$numAtom]);
        push(@comAtom,$cell);
        push(@comAtom,$potType[$numAtom]);
        push(@comAtom,$elementSym[$numAtom]);
        push(@comAtom,$partialCharge[$numAtom]);
      }
      # Si la celda en construcción es del tipo "borde derecho"...
      if($despX==$unitCellX-1 and $despY!=$unitCelly-1){
        # ..guarda la información de los átomos comunes en el
        # arreglo @comAtom...
        if($numAtom!=19 and $numAtom!=27){
          push(@comAtom,$atomName[$numAtom]);
          push(@comAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd);
          push(@comAtom,$yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY);
          push(@comAtom,$zCor[$numAtom]);
          push(@comAtom,$resType[$numAtom]);
          push(@comAtom,$cell);
          push(@comAtom,$potType[$numAtom]);
          push(@comAtom,$elementSym[$numAtom]);
          push(@comAtom,$partialCharge[$numAtom]);
        }
        # ..o guarda la información de los átomos O12 y H2 (desplazados al
        # extremo izquierdo), en el arreglo @leftAtom.
```

```

if($numAtom==19 or $numAtom==27){
  push(@lefAtom,$atomName[$numAtom]);
  # ... Esto solo se cumplirá si la variable $rectangular fue
  conFigurada como "yes". De lo contrario, los átomos no serán desplazados.
  if ($rectangular eq "yes"){
    push(@lefAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd);
  }
  else{
    push(@lefAtom,($xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd)-
(5.154*($despX+1)));
  }
  push(@lefAtom,$yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY);
  push(@lefAtom,$zCor[$numAtom]);
  push(@lefAtom,$resType[$numAtom]);
  push(@lefAtom,$cell);
  push(@lefAtom,$potType[$numAtom]);
  push(@lefAtom,$elementSym[$numAtom]);
  push(@lefAtom,$partialCharge[$numAtom]);
}
}
# Si la celda en construcción es del tipo "borde superior"...
if($despX!=$unitCellX-1 and $despY==$unitCellY-1){
  # ...guarda la información de los átomos comunes en el arreglo
@comAtom
  if($numAtom!=26){
    push(@comAtom,$atomName[$numAtom]);
    push(@comAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd);
    push(@comAtom,$yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY);
    push(@comAtom,$zCor[$numAtom]);
    push(@comAtom,$resType[$numAtom]);
    push(@comAtom,$cell);
    push(@comAtom,$potType[$numAtom]);
    push(@comAtom,$elementSym[$numAtom]);
    push(@comAtom,$partialCharge[$numAtom]);
  }
  # ...o guarda la información de los átomos H1 (desplazados al
extremo inferior) en el arreglo @botAtom
  if($numAtom==26){
    push(@botAtom,$atomName[$numAtom]);
    # ... Esto solo se cumplirá si la variable $rectangular fue
conFigurada como "yes". De lo contrario, los átomos no serán desplazados.
    if ($rectangular eq "yes"){
      push(@botAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd);
      push(@botAtom,$yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY);
    }
    else{
      push(@botAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd-
0.093640215);
      push(@botAtom,($yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY)-
(($despY+1)*8.941945522));
    }
    push(@botAtom,$zCor[$numAtom]);
    push(@botAtom,$resType[$numAtom]);
    push(@botAtom,$cell);
    push(@botAtom,$potType[$numAtom]);
    push(@botAtom,$elementSym[$numAtom]);
    push(@botAtom,$partialCharge[$numAtom]);
  }
}

```

```

    }
  }
  # Si la celda en construcción es del tipo "esquina superior
derecha"...
  if($despX==$unitCellX-1 and $despY==$unitCellY-1){
    # ...guarda la información de los átomos comunes en el arreglo
@comAtom
    if($numAtom!=19 and $numAtom!=26 and $numAtom!=27){
      push(@comAtom,$atomName[$numAtom]);
      push(@comAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd);
      push(@comAtom,$yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY);
      push(@comAtom,$zCor[$numAtom]);
      push(@comAtom,$resType[$numAtom]);
      push(@comAtom,$cell);
      push(@comAtom,$potType[$numAtom]);
      push(@comAtom,$elementSym[$numAtom]);
      push(@comAtom,$partialCharge[$numAtom]);
    }
    # ..o guarda la información de los átomos O8 y H2 (desplazados al
extremo izquierdo), en el arreglo @leftAtom...
    if($numAtom==19 or $numAtom==27){
      push(@leftAtom,$atomName[$numAtom]);
      # ... Esto solo se cumplirá si la variable $rectangular fue
conFigurada como "yes". De lo contrario, los átomos no serán desplazados.
      if ($rectangular eq "yes"){
        push(@leftAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd);
      }
      else{
        push(@leftAtom,($xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd)-
(5.154*($despX+1)));
      }
      push(@leftAtom,$yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY);
      push(@leftAtom,$zCor[$numAtom]);
      push(@leftAtom,$resType[$numAtom]);
      push(@leftAtom,$cell);
      push(@leftAtom,$potType[$numAtom]);
      push(@leftAtom,$elementSym[$numAtom]);
      push(@leftAtom,$partialCharge[$numAtom]);
    }
    # ...o guarda la información de los átomos H1 (desplazados al
extremo inferior) en el arreglo @botAtom.
    if($numAtom==26){
      push(@botAtom,$atomName[$numAtom]);
      # ... Esto solo se cumplirá si la variable $rectangular fue
conFigurada como "yes". De lo contrario, los átomos no serán desplazados.
      if ($rectangular eq "yes"){
        push(@botAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd);
        push(@botAtom,$yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY);
      }
      else{
        push(@botAtom,$xCor[$numAtom]+5.154*$despX+$despXAd-
0.093640215);
        push(@botAtom,($yCor[$numAtom]+8.941945522*$despY)-
(($despY+1)*8.941945522));
      }
      push(@botAtom,$zCor[$numAtom]);
      push(@botAtom,$resType[$numAtom]);
    }
  }
}

```

```

        push(@botAtom,$cell);
        push(@botAtom,$spotType[$numAtom]);
        push(@botAtom,$elementSym[$numAtom]);
        push(@botAtom,$partialCharge[$numAtom]);
    }
}
}
}
$cell++;
}
}

# Finalmente, se escribe el archivo .car de forma ordenada, con la
información recabada.
if ($rectangular eq "yes"){
    open (OUTFILE, "> kaolinite_". $unitCellX. "x". $unitCellY. "_R.car");
}
else{
    open (OUTFILE, "> kaolinite_". $unitCellX. "x". $unitCellY. "_NR.car");
}
printf OUTFILE
"!BIOSYM archive 3
PBC=ON
Gabriel J. Olguin-Orellana's Support Software Generated CAR File
!DATE $date
PBC %6.4f %6.4f %6.4f 90.0000 90.0000 90.0000
(P1)\n", $unitCellX*5.1540, $unitCellY*8.9420, $unitCellY*8.9420;

for($i=0;$i<($unitCellX*$unitCellY*34*9)-
(9*($unitCellY*2+$unitCellX*1));$i+=9){
    printf OUTFILE "%-5s %14.9f %14.9f %14.9f %4s %-7s%-7s %-2s %6s\n",
    $comAtom[$i], $comAtom[$i+1], $comAtom[$i+2], $comAtom[$i+3], $comAtom[$i+4], $c
omAtom[$i+5],
    $comAtom[$i+6], $comAtom[$i+7], $comAtom[$i+8];
}
$count=0;
for($i=0;$i<$unitCellY*2*9;$i+=9){
    printf OUTFILE "%-5s %14.9f %14.9f %14.9f %4s %-7s%-7s %-2s %6s\n",
    $lefAtom[$i], $lefAtom[$i+1], $lefAtom[$i+2], $lefAtom[$i+3], $lefAtom[$i+4], $c
ell,
    $lefAtom[$i+6], $lefAtom[$i+7], $lefAtom[$i+8];
    $count++;
    if($count==2){
        $cell++;
        $count=0;
    }
}
for($i=0;$i<$unitCellX*1*9;$i+=9){
    printf OUTFILE "%-5s %14.9f %14.9f %14.9f %4s %-7s%-7s %-2s %6s\n",
    $botAtom[$i], $botAtom[$i+1], $botAtom[$i+2], $botAtom[$i+3], $botAtom[$i+4], $c
ell,
    $botAtom[$i+6], $botAtom[$i+7], $botAtom[$i+8];
    $cell++;
}
}
}

```

```

printf OUTFILE "end\nend\n";

close(OUTFILE);
undef @comAtom;
undef @botAtom;
undef @lefAtom;
undef @aux;

#####
#   DISEÑANDO EL ARCHIVO .MDF                               #
#####

# Para manejar los datos del archivo .mdf de la celda unitaria, cada
columna de este se almacena en su propio arreglo. Notar que aquellos
valores que son constantes se desechan.
for ($numAtom=0;$numAtom<34;$numAtom++){
  @line=split /\s+/, $unitCellMdf[$numAtom+21];
  $column=0;
  push(@aux,$line[$column]);
  push(@element,$line[$column+1]);
  push(@atomType,$line[$column+2]);
  push(@aux,$line[$column+3]);
  push(@aux,$line[$column+4]);
  push(@formalCharge,$line[$column+5]);
  push(@charge,$line[$column+6]);
  push(@aux,$line[$column+7]);
  push(@aux,$line[$column+8]);
  push(@aux,$line[$column+9]);
  push(@aux,$line[$column+10]);
  push(@aux,$line[$column+11]);
  while(defined($line[$column+12])){
    push(@aux,$line[$column+12]);
    $column++;
  }
}
undef @aux;

# Nuevamente la información de cada átomo en construcción es almacenada en
distintos arreglos de acuerdo al tipo de átomo que es.

$cell=1;
$elementVar=1;
# Mientras no se hayan construido todas las celdas unitarias en y...
for ($despY=0;$despY<$unitCellY;$despY++){
  # ...y mientras no se hayan construido todas las celdas unitarias en x.
  for ($despX=0;$despX<$unitCellX;$despX++){
    # Para cada nuevo átomo, evaluar:
    for ($numAtom=0;$numAtom<34;$numAtom++){
      # Si es un átomo común. Si lo es, guarda su información en el arreglo
      @comAtom (excepto la conectividad)
      if(($cell%$unitCellX!=0 or ($element[$numAtom])ne("O") or
$elementVar!=12) and
($cell%$unitCellX!=0 or ($element[$numAtom])ne("H") or
$elementVar!=2) and

```

```

($cell<=$unitCellX*($unitCellY-1) or ($element[$numAtom])ne("H") or
$selementVar!=1)){
    push(@comAtom,"XXXX_$cell:$element[$numAtom]$selementVar ");
    push(@comAtom,"$element[$numAtom]");
    push(@comAtom,"$atomType[$numAtom]");
    push(@comAtom,"?");
    push(@comAtom,"0");
    push(@comAtom,$formalCharge[$numAtom]);
    push(@comAtom,$charge[$numAtom]);
    push(@comAtom,"0");
    push(@comAtom,"0");
    push(@comAtom,"8");
    push(@comAtom,"1");
    push(@comAtom,"0");
}
# Si es un átomo del extremo izquierdo de la lámina. Si lo es, guarda
su información en el arreglo @leftAtom (excepto la conectividad)
elseif(($cell%$unitCellX==0 and ($element[$numAtom])eq("O") and
$selementVar==12) or
($cell%$unitCellX==0 and ($element[$numAtom])eq("H") and
$selementVar==2)){
    $newCell=$unitCellX*$unitCellY+$cell/$unitCellX;
    push(@leftAtom,"XXXX_$newCell:$element[$numAtom]$selementVar ");
    push(@leftAtom,"$element[$numAtom]");
    push(@leftAtom,"$atomType[$numAtom]");
    push(@leftAtom,"?");
    push(@leftAtom,"0");
    push(@leftAtom,$formalCharge[$numAtom]);
    push(@leftAtom,$charge[$numAtom]);
    push(@leftAtom,"0");
    push(@leftAtom,"0");
    push(@leftAtom,"8");
    push(@leftAtom,"1");
    push(@leftAtom,"0");
}
# Si es un átomo del extremo inferior de la lámina. Si lo es, guarda
su información en el arreglo @botAtom (excepto la conectividad)
else{
    $newCell=$cell+$unitCellX+$unitCellY;
    push(@botAtom,"XXXX_$newCell:$element[$numAtom]$selementVar ");
    push(@botAtom,"$element[$numAtom]");
    push(@botAtom,"$atomType[$numAtom]");
    push(@botAtom,"?");
    push(@botAtom,"0");
    push(@botAtom,$formalCharge[$numAtom]);
    push(@botAtom,$charge[$numAtom]);
    push(@botAtom,"0");
    push(@botAtom,"0");
    push(@botAtom,"8");
    push(@botAtom,"1");
    push(@botAtom,"0");
}
# La información más relevante del archivo .mdf es la conectividad
atómica, dada en la columna 12 de dicho archivo. La conectividad de cada
átomo varía de acuerdo al tipo de átomo, el tipo de celda al que pertenece
y la posición que ocupa en el espacio. Con estos antecedentes es posible
saber si un átomo se conecta con otros de una celda contigua "real" o con

```

celdas generadas por las PBC. A continuación, mediante una serie de condiciones, se determina a que grupo de átomos pertenece cada uno en particular, y se almacena la conectividad en el arreglo correspondiente, para completar su información. Aquellos átomos que conectan solo con otros de su misma celda poseen conectividad constante, por lo que no necesitan mayor tratamiento.

```

# $numAtom=0 es A11.
if($numAtom==0){
  push(@comAtom,"01 02 013 015 016 018 ");
}
# $numAtom=1 es A12.
if($numAtom==1){
  push(@comAtom,"02 06 011 014 016 017 ");
}
# $numAtom=2 es A13.
if($numAtom==2){
  # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
  borde derecho ni borde superior.
  if($cell%$unitCellX!=0 and $cell<=$unitCellX*($unitCellY-1)){
    $rightCell=$cell+1;
    $botCell=$cell+$unitCellX;
    push(@comAtom,"06 017 XXXX_$botCell:07 XXXX_$rightCell:011
XXXX_$botCell:012 XXXX_$rightCell:014 ");
  }
  # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
  borde derecho, excepto la celda de la esquina superior derecha.
  elseif($cell%$unitCellX==0 and $cell<=$unitCellX*($unitCellY-1)){
    $OAtom=$unitCellX*$unitCellY+($cell/$unitCellX)+1;
    $rightCell=$cell-($unitCellX-1);
    $botCell=$cell+$unitCellX;
    push(@comAtom,"06 017 XXXX_$botCell:07
XXXX_$rightCell:011%100#1 XXXX_$OAtom:012%100#1 XXXX_$rightCell:014%100#1
");
  }
  # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
  borde superior, excepto la celda de la esquina superior derecha.
  elseif($cell>$unitCellX*($unitCellY-1) and
$cell!=$unitCellX*$unitCellY){
    $rightCell=$cell+1;
    $botCell=$cell-$unitCellX*($unitCellY-1);
    push(@comAtom,"06 017 XXXX_$botCell:07%010#1
XXXX_$rightCell:011 XXXX_$botCell:012%010#1 XXXX_$rightCell:014 ");
  }
  # Se guarda la información de los el átomo de la celda de la
  esquina superior derecha.
  else{
    $OAtom=$unitCellX*$unitCellY+1;
    $rightCell=$cell-($unitCellX-1);
    $botCell=$cell-$unitCellX*($unitCellY-1);
    push(@comAtom,"06 017 XXXX_$botCell:07%010#1
XXXX_$rightCell:011%100#1 XXXX_$OAtom:012%110#1 XXXX_$rightCell:014%100#1
");
  }
}
# $numAtom=3 es A14.
if($numAtom==3){

```

```

# Se guarda la información de los átomos que no son de celdas del
borde derecho.
if($cell%$unitCellX!=0){
  $rightCell=$cell+1;
  push(@comAtom,"07 012 015 018 XXXX_$rightCell:01
XXXX_$rightCell:013 ");
}
# Se guarda la información de los átomos que son de celdas del
borde derecho.
else{
  $OAtom=$unitCellX*$unitCellY+$cell/$unitCellX;
  $rightCell=$cell-($unitCellX-1);
  push(@comAtom,"07 XXXX_$OAtom:012%100#1 015 018
XXXX_$rightCell:01%100#1 XXXX_$rightCell:013%100#1 ");
}
}
# $numAtom=4 es Si1.
if($numAtom==4){
# Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde izquierdo.
if($cell%$unitCellX==1){
  $leftCell=$cell+($unitCellX-1);
  push(@comAtom,"01 03 04 XXXX_$leftCell:010%-100#1 ");
}
# Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde izquierdo.
else{
  $leftCell=$cell-1;
  push(@comAtom,"01 03 04 XXXX_$leftCell:010 ");
}
}
# $numAtom=5 es Si2.
if($numAtom==5){
# Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde izquierdo.
if($cell%$unitCellX==1){
  $leftCell=$cell+($unitCellX-1);
  push(@comAtom,"02 03 05 XXXX_$leftCell:09%-100#1 ");
}
# Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde izquierdo.
else{
  $leftCell=$cell-1;
  push(@comAtom,"02 03 05 XXXX_$leftCell:09 ");
}
}
# $numAtom=6 corresponde a Si3.
if($numAtom==6){
# Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde superior.
if($cell<=$unitCellX*($unitCellY-1)){
  $botCell=$cell+$unitCellX;
  push(@comAtom,"05 06 09 XXXX_$botCell:08 ");
}
# Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde superior.
else{

```

```

        $botCell=$cell-$unitCellX*($unitCellY-1);
        push(@comAtom,"O5 O6 O9 XXXX_$botCell:O8%010#1 ");
    }
}
# $numAtom=7 corresponde a Si4.
if($numAtom==7){
    push(@comAtom,"O4 O7 O8 O10 ");
}
# $numAtom=8 corresponde a O1.
if($numAtom==8){
    # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde izquierdo.
    if($cell%$unitCellX==1){
        $leftCell=$cell+($unitCellX-1);
        push(@comAtom,"Al1 Si1 XXXX_$leftCell:Al4%-100#1 ");
    }
    # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde izquierdo.
    else{
        $leftCell=$cell-1;
        push(@comAtom,"Al1 Si1 XXXX_$leftCell:Al4 ");
    }
}
# $numAtom=9 corresponde a O2.
if($numAtom==9){
    push(@comAtom,"Al1 Al2 Si2 ");
}
# $numAtom=10 corresponde a O3.
if($numAtom==10){
    push(@comAtom,"Si1 Si2 ");
}
# $numAtom=11 corresponde a O4.
if($numAtom==11){
    push(@comAtom,"Si1 Si4 ");
}
# $numAtom=12 corresponde a O5.
if($numAtom==12){
    push(@comAtom,"Si2 Si3 ");
}
# $numAtom=13 corresponde a O6.
if($numAtom==13){
    push(@comAtom,"Al2 Al3 Si3 ");
}
# $numAtom=14 corresponde a O7.
if($numAtom==14){
    # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde inferior.
    if($cell<=$unitCellX){
        $topCell=$cell+$unitCellX*($unitCellY-1);
        push(@comAtom,"Al4 Si4 XXXX_$topCell:Al3%0-10#1 ");
    }
    # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde inferior.
    else{
        $topCell=$cell-$unitCellX;
        push(@comAtom,"Al4 Si4 XXXX_$topCell:Al3 ");
    }
}

```

```

}
# $numAtom=15 corresponde a O8.
if($numAtom==15){
  # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde superior.
  if($cell<=$unitCellX){
    $topCell=$cell+$unitCellX*($unitCellY-1);
    push(@comAtom,"Si4 XXXX_$topCell:Si3%0-10#1 ");
  }
  # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde superior.
  else{
    $topCell=$cell-$unitCellX;
    push(@comAtom,"Si4 XXXX_$topCell:Si3 ");
  }
}
# $numAtom=16 corresponde a O9.
if($numAtom==16){
  # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde derecho.
  if($cell%$unitCellX==0){
    $rightCell=$cell-($unitCellX-1);
    push(@comAtom,"Si3 XXXX_$rightCell:Si2%100#1 ");
  }
  # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde derecho.
  else{
    $rightCell=$cell+1;
    push(@comAtom,"Si3 XXXX_$rightCell:Si2 ");
  }
}
# $numAtom=17 corresponde a O10.
if($numAtom==17){
  # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde derecho.
  if($cell%$unitCellX==0){
    $rightCell=$cell-($unitCellX-1);
    push(@comAtom,"Si4 XXXX_$rightCell:Si1%100#1 ");
  }
  # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde derecho.
  else{
    $rightCell=$cell+1;
    push(@comAtom,"Si4 XXXX_$rightCell:Si1 ");
  }
}
# $numAtom=18 corresponde a O11.
if($numAtom==18){
  # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde izquierdo, excepto la esquina superior izquierda.
  if($cell%$unitCellX==1 and $cell<=$unitCellX*($unitCellY-1)){
    $leftCell=$cell+($unitCellX-1);
    push(@comAtom,"Al2 H1 XXXX_$leftCell:Al3%-100#1 ");
  }
  # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde izquierdo ni de borde superior.
  elsif($cell%$unitCellX!=1 and $cell<=$unitCellX*($unitCellY-1)){

```

```

        $leftCell=$cell-1;
        push(@comAtom,"A12 H1 XXXX_$leftCell:A13 ");
    }
    # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde superior, excepto la esquina superior izquierda.
    elsif($cell>$unitCellX*($unitCellY-1)+1){
        $topAtom=$cell+$unitCellX+$unitCellY;
        $leftAtom=$cell-1;
        push(@comAtom,"A12 XXXX_$topAtom:H1%010#1 XXXX_$leftAtom:A13
");
    }
    # Se guarda la información de los la celda de la esquina superior
izquierda.
    else{
        $topAtom=$cell+$unitCellX+$unitCellY;
        $leftAtom=$cell+($unitCellX-1);
        push(@comAtom,"A12 XXXX_$topAtom:H1%010#1 XXXX_$leftAtom:A13%-
100#1 ");
    }
}
# $numAtom=19 corresponde a O12.
if($numAtom==19){
    # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde inferior, excepto la celda de la esquina inferior derecha.
    if($cell<$unitCellX){
        $topCell=$cell+$unitCellX*($unitCellY-1);
        push(@comAtom,"A14 H2 XXXX_$topCell:A13%0-10#1 ");
    }
    # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde inferior ni de celdas de borde derecho.
    elsif($cell>$unitCellX and $cell%$unitCellX!=0){
        $topCell=$cell-$unitCellX;
        push(@comAtom,"A14 H2 XXXX_$topCell:A13 ");
    }
    # Se guarda la información de los el átomo que está posicionado
al extremo izquierdo inferior de la superficie
    elsif($cell==$unitCellX){
        $leftCell=$cell;
        $topCell=$cell+$unitCellX*($unitCellY-1);
        push(@leftAtom,"XXXX_$leftCell:A14%-100#1 H2
XXXX_$topCell:A13%-1-10#1 ");
    }
    # Se guarda la información de los demás átomos que están al
extremo izquierdo de la superficie
    else{
        $leftCell=$cell;
        $topCell=$cell-$unitCellX;
        push(@leftAtom,"XXXX_$leftCell:A14%-100#1 H2
XXXX_$topCell:A13%-100#1 ");
    }
}
# $numAtom=20 corresponde a O13.
if($numAtom==20){
    # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde izquierdo.
    if($cell%$unitCellX==1){

```

```

        $leftCell=$cell+($unitCellX-1);
        push(@comAtom,"A11 H3 XXXX_$leftCell:A14%-100#1 ");
    }
    # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde izquierdo.
    else{
        $leftCell=$cell-1;
        push(@comAtom,"A11 H3 XXXX_$leftCell:A14 ");
    }
}
# $numAtom=21 corresponde a O14.
if($numAtom==21){
    # Se guarda la información de los átomos que son de celdas de
borde izquierdo.
    if($cell%$unitCellX==1){
        $leftCell=$cell+($unitCellX-1);
        push(@comAtom,"A12 H4 XXXX_$leftCell:A13%-100#1 ");
    }
    # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde izquierdo.
    else{
        $leftCell=$cell-1;
        push(@comAtom,"A12 H4 XXXX_$leftCell:A13 ");
    }
}
# $numAtom=22 corresponde a 15.
if($numAtom==22){
    push(@comAtom,"A11 A14 H5 ");
}
# $numAtom=23 corresponde a 16.
if($numAtom==23){
    push(@comAtom,"A11 A12 H6 ");
}
# $numAtom=24 corresponde a 17.
if($numAtom==24){
    push(@comAtom,"A12 A13 H7 ");
}
# $numAtom=25 corresponde a O18.
if($numAtom==25){
    push(@comAtom,"A11 A14 H8 ");
}
# $numAtom=26 corresponde a H1.
if($numAtom==26){
    # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas del
borde superior.
    if($cell<=$unitCellX*($unitCellY-1)){
        push(@comAtom,"O11 ");
    }
    # Se guarda la información de los átomos que se posicionan en el
extremo superior la superficie.
    else{
        push(@botAtom,"XXXX_$cell:O11%0-10#1 ");
    }
}
# $numAtom=27 corresponde a H2.
if($numAtom==27){

```

```

        # Se guarda la información de los átomos que no son de celdas de
borde derecho.
        if($cell%$unitCellX!=0){
            push(@comAtom,"O12 ");
        }
        # Se guarda la información de los átomos que se posicionan al
extremo izquierdo de la superficie.
        else{
            push(@leftAtom,"O12 ");
        }
    }
    # $numAtom=28 corresponde a H3.
    if($numAtom==28){
        push(@comAtom,"O13 ");
    }
    # $numAtom=29 corresponde a H4.
    if($numAtom==29){
        push(@comAtom,"O14 ");
    }
    # $numAtom=30 corresponde a H5.
    if($numAtom==30){
        push(@comAtom,"O15 ");
    }
    # $numAtom=31 corresponde a H6.
    if($numAtom==31){
        push(@comAtom,"O16 ");
    }
    # $numAtom=32 corresponde a H7.
    if($numAtom==32){
        push(@comAtom,"O17 ");
    }
    # $numAtom=33 corresponde a H8.
    if($numAtom==33){
        push(@comAtom,"O18 ");
    }
    if(defined($element[$numAtom+1]) and
($element[$numAtom])eq($element[$numAtom+1])){
        $elementVar++;
    }
    else{
        $elementVar=1;
    }
}
$cell++;
}
}

# Finalmente, se escribe el archivo .mdf de forma ordenada, con la
información recabada.

if ($rectangular eq "yes"){
    open (OUTFILE, "> kaolinite_".$unitCellX."x".$unitCellY."_R.mdf");
}
else{
    open (OUTFILE, "> kaolinite_".$unitCellX."x".$unitCellY."_NR.mdf");
}
}

```

```

print OUTFILE
"!BIOSYM molecular_data 4

!Date: $date   Gabriel J. Olguin-Orellana's Support Software Generated MDF
file

#topology

\@column 1 element
\@column 2 atom_type
\@column 3 charge_group
\@column 4 isotope
\@column 5 formal_charge
\@column 6 charge
\@column 7 switching_atom
\@column 8 oop_flag
\@column 9 chirality_flag
\@column 10 occupancy
\@column 11 xray_temp_factor
\@column 12 connections

\@molecule kaolinite_$unitCellX*$unitCellY\_cells\n\n";

for ($i=0;$i<($unitCellX*$unitCellY*34*13)-
(13*($unitCellY*2+$unitCellX));$i+=13){
  printf OUTFILE "%-19s %-2s %-7s %-5s %-2s %-4s %7.4f %-1s %-1s %-1s %.4f
%.4f %s\n",

$comAtom[$i],$comAtom[$i+1],$comAtom[$i+2],$comAtom[$i+3],$comAtom[$i+4],$c
omAtom[$i+5],

$comAtom[$i+6],$comAtom[$i+7],$comAtom[$i+8],$comAtom[$i+9],$comAtom[$i+10]
,$comAtom[$i+11],$comAtom[$i+12];
}
for ($i=0;$i<13*($unitCellY*2);$i+=13){
  printf OUTFILE "%-19s %-2s %-7s %-5s %-2s %-4s %7.4f %-1s %-1s %-1s %.4f
%.4f %s\n",

$leftAtom[$i],$leftAtom[$i+1],$leftAtom[$i+2],$leftAtom[$i+3],$leftAtom[$i+
4],$leftAtom[$i+5],

$leftAtom[$i+6],$leftAtom[$i+7],$leftAtom[$i+8],$leftAtom[$i+9],$leftAtom[$
i+10],$leftAtom[$i+11],$leftAtom[$i+12];
}
for ($i=0;$i<13*$unitCellX;$i+=13){
  printf OUTFILE "%-19s %-2s %-7s %-5s %-2s %-4s %7.4f %-1s %-1s %-1s %.4f
%.4f %s\n",

$botAtom[$i],$botAtom[$i+1],$botAtom[$i+2],$botAtom[$i+3],$botAtom[$i+4],$b
otAtom[$i+5],

$botAtom[$i+6],$botAtom[$i+7],$botAtom[$i+8],$botAtom[$i+9],$botAtom[$i+10]
,$botAtom[$i+11],$botAtom[$i+12];
}
print OUTFILE "
!
#symmetry

```

```

\@periodicity 3 xyz
\@group (P1)

#end\n";

close (OUTFILE);

if ($rectangular eq "yes"){
  open (LOG, "> kaolinite_".$unitCellX."x".$unitCellY."_R.log");
}

else{
  open (LOG, "> kaolinite_".$unitCellX."x".$unitCellY."_NR.log");
}

printf LOG "Se construyó una superficie de ".$unitCellX."x".$unitCellY."x1
celdas unitarias, equivalentes a
".$unitCellX*5.13217738."x".$unitCellY*8.90593483333."x5.3999591916799545
Armstrong.";
close (LOG);

exit;

```

8.2. Anexo 2: Script solvate.tcl

```
#####  
# solvate.tcl #  
# -----#  
# Este script en TCL crea una caja de agua de tamaño determinado por #  
# el usuario para una molécula. #  
# #  
# Entradas: #  
# - Nombre del archivo .pdb de la molécula #  
# - Nombre del archivo .psf de la molécula #  
# - Tamaño de la caja de agua. #  
# #  
# Salidas: #  
# - Archvo .pdb y .psf de la molécula solvatada #  
# #  
#####  
  
package require solvate  
  
# Entradas:  
set pdbName "1HZH_M_RU"; # Nombre de los archivos de la molécula a  
solvatar.  
set psfName ""  
set WB {{42.62099838256836 34.17300033569336 7.150000095367432}  
{142.38699340820313 191.66299438476563 123.93399810791016}}; #  
Dimensiones de la caja de agua  
  
# Solvatación  
solvate $psfName.psf $pdbName.pdb -minmax $WB -o $pdbName\_WB
```

8.3. Anexo 3: Script replaceCoordinates.pl

```
#####
#replaceCoordinates.pl
#-----#
# El siguiente script soluciona el error cometido por psfgen al #
# escribir las coordenadas de los átomos de la superficie, cuando #
# es solvatada con el script solvate.tcl y cuando se une a la proteína #
# solvada con el módulo Merge Structures de VMD (error mencionado en #
# documentación de interfaceFF_v1.5). El script reemplaza en el .pdb #
# erróneo las coordenadas atómicas incorrectas por las correctas, las #
# cuales obtiene del .pdb de la superficie sola. Los archivos .psf se #
# dejan intactos.
#
# Entradas:
# - Archivo .pdb con las coordenadas atómicas de la superficie #
# incorrectas
# - archivo .pdb de la superficie sola
# - número de celdas que tiene la superficie en el eje x
# - número de celdas que tiene la superficie en el eje y
#
# Salidas:
# - Archivo .pdb con las coordenadas atómicas corregidas
#
# Condición:
# - En el archivo .pdb erróneo, las coordenadas atómicas de la #
# superficie deben estar listadas antes que las de cualquier otra #
# molécula
#
#####

#!/usr/bin/perl -w

# Entradas:
if (1){
    $originalFi="kaolinite_38x22_R_MD";      # Nombre del archivo que tiene
las coordenadas correctas.
    $psfgenFi="1HZH_kaolinite_WB";        # Nombre del archivo con las
coordenadas incorrectas.
    $xCeIl="38";      # Cantidad de celdas que posee la superficie en el eje
x.
    $yCeIl="22";      # Cantidad de celdas que posee la superficie en el eje
y.
}

open (LOG, ">".$psfgenFi."_correction.log");

# Abre los archivos. Si no lo consigue, detiene la ejecución. A
continuación, los almacena en arreglos independientes.
unless ( (open (ORIGINAL,$originalFi.".pdb")) and (open (PSFGEN,$psfgenFi.".pdb"))
){
```

```

    printf LOG "Problemas al intentar abrir los archivos. Revise que existan
y que los nombres sean correctos\n\n";
    close (LOG);
    exit;
}

@originalFi=<ORIGINAL>;
@psfgenFi=<PSFGEN>;

# Cuenta las líneas que tiene el archivo y le resta 2 para tener el número
de átomos.
$surfaceAtoms=scalar(@originalFi)-2;
$totalAtoms=scalar(@psfgenFi)-2;

close ORIGINAL;
close PSFGEN;

$column=0;
# Del archivo de la superficie sola rescata únicamente las coordenadas
atómicas,
for($atomLine=1;$atomLine<=$surfaceAtoms;$atomLine++){
    @line=split /\s+/, $originalFi[$atomLine];
    push(@aux,$line[$column+1]);
    push(@aux,$line[$column+2]);
    push(@aux,$line[$column+3]);
    push(@aux,$line[$column+4]);
    push(@xCor,$line[$column+5]);
    push(@yCor,$line[$column+6]);
    push(@zCor,$line[$column+7]);
    push(@aux,$line[$column+8]);
    push(@aux,$line[$column+9]);
    push(@aux,$line[$column+10]);
    push(@aux,$line[$column+11]);
    push(@aux,$line[$column+12]);
}

$column=0;
# mientras que del archivo errático rescata la demás información que no es
constante, de cada átomo.
for($atomLine=1;$atomLine<=$totalAtoms;$atomLine++){
    if($atomLine<=$surfaceAtoms){
        @line=split /\s+/, $psfgenFi[$atomLine];
        push(@aux,$line[$column]);
        push(@number,$line[$column+1]);
        push(@element,$line[$column+2]);
        push(@aux,$line[$column+3]);
        push(@aux,$line[$column+4]);
        push(@aux,$line[$column+5]);
        push(@aux,$line[$column+6]);
        push(@aux,$line[$column+7]);
        push(@aux,$line[$column+8]);
        push(@aux,$line[$column+9]);
        push(@aux,$line[$column+10]);
    }
}
}

```

```

# Luego, define variables con aquellos valores que son constantes en el
archivo,
$atom="ATOM";
$residue="XXXX";
$chain="S";
$occupancy="-1.00";
$tempF="0.00";
$SURF="SURF";
$flag=0;
$cell=1;
$unitCellX=5.13217738;
$unitCellY=8.90593483333;

# reescribe el encabezado y...
open (OUTFILE, ">".$psfgenFi.".pdb");
printf OUTFILE
"CRYST1 %6.3f %6.3f 25.250 90.00 90.00 90.00 P 1
1\n", $unitCellX*$xCell, $unitCellY*$yCell;

# ...el resto del archivo. Primero escribe las celdas que son parte de la
superficie y luego las de los átomos desplazados hacia el extremo izquierdo
e inferior, pues se agrupan en celdas independientes. La variable $flag
representa la cantidad de átomos que le falta a cada celda, si todas
tuvieran 34 átomos, al igual que la celda unitaria (i.e. Observar la
columna 6 (correspondiente al número de residuo/celda) del archivo de la
superficie y como estas se visualizan en VMD)
for ($i=0; $i<$surfaceAtoms; $i+=1) {
    $flag++;
    if ($flag==35) {
        $cell++;
        # Las celdas comunes tienen 34 átomos,
        if ($cell%$xCell!=0 and $cell<=$xCell*($yCell-1)) {
            $flag=1;
        }
        # las celdas de borde superior tienen 33 átomos,
        if ($cell>$xCell*($yCell-1) and $cell<$xCell*$yCell) {
            $flag=2;
        }
        # las celdas de borde derecho tienen 32 átomos,
        if ($cell%$xCell==0 and $cell<=$xCell*($yCell-1)) {
            $flag=3;
        }
        # la celda de la esquina superior derecha tiene 31 átomos,
        if ($cell==$xCell*$yCell) {
            $flag=4;
        }
        # las celdas del extremo izquierdo tienen 2 átomos
        if ($cell>$xCell*$yCell and $cell<=$xCell*$yCell+$yCell) {
            $flag=33;
        }
        # y las celdas del extremo inferior tienen 1 átomo.
        if ($cell>$xCell*$yCell+$yCell) {
            $flag=34;
        }
    }
}

```

```

# En cada iteración reescribe una línea del archivo.
printf OUTFILE "%-6s%5s  %-4s%-3s%1s%4s      %8s%8s%8s %5s %5s      %4s\n",
$atom,$number[$i],$element[$i],$residue,$chain,$cell,$xCor[$i],
$yCor[$i],$zCor[$i],$occupancy,$tempF,$SURF;
}

# Finalmente, añade al final del archivo el resto de los átomos,
correspondientes al agua...
for($i=$surfaceAtoms+1;$i<=$totalAtoms;$i++){
  print OUTFILE $psfgenFi[$i];
}

# ...y genera el archivo de registro.
printf LOG "El remplazo de las coordenadas atómicas finalizó con éxito";
close (LOG);
exit;

```

8.4. Anexo 4: Script PSFProtein.tcl

```
#####  
# PSFProtein.tcl #  
# -----#  
# El siguiente script crea los archivos .pdb y .psf para la IgG1 b12, #  
# añadiendo el extremo C-terminal en su forma desprotonada, el #  
# N-terminal en su forma protonada y las histidinas en su estado no #  
# ionizado, tal como se encuentra la proteína en una solución a #  
# pH neutro. Además, crea los enlaces disulfuros intra- e #  
# intercatenarios y restituye los nombres de las cadenas puestos por #  
# Modeller por los que posee el lhzh.pdb, para mayor comprensión. #  
# #  
# Entradas: #  
# - Archivo .pdb de la IgG1 b12 reconstruida estructuralmente #  
# #  
# Salidas: #  
# - Archivo .pdb de la IgG1 b12 con los nombres de los átomos, #  
# residuos y cadenas sustituidos, y los átomos de hidrógeno #  
# - Archivo .psf de la IgG1 b12 con los enlaces disulfuros entre #  
# las cisteínas #  
# #  
#####  
  
# Entradas:  
set name "1HZH_M"; # Nombre de archivo .pdb de la IgG b12  
  
resetpsf  
package require psfgen  
topology top_all27_prot_na.rtf  
  
# Aplica alias a los nombres de residuos y átomos para no tener choques  
entre la nomenclatura del .pdb y el campo de fuerza.  
pdbalias residue HIS HSD  
pdbalias atom SER HG HG1  
pdbalias atom ILE CD1 CD  
pdbalias atom CYS HG HG1  
pdbalias atom ILE 1HD1 HD1  
pdbalias atom ILE 2HD1 HD2  
pdbalias atom ILE 3HD1 HD3  
  
mol load pdb $name.pdb  
  
# Se crean los distintos segmentos de la proteína, añadiendo los extremos  
terminales y remplazando el nombre de las cadenas.  
$chainH writepdb H.pdb  
segment H {first NTER; last CTER; pdb H.pdb}  
coordpdb H.pdb H  
  
set chainK [atomselect top "all and chain B"]  
$chainK writepdb K.pdb  
segment K {first NTER; last CTER; pdb K.pdb}
```

```

coordpdb K.pdb K

set chainL [atomselect top "all and chain C"]
$chainL writepdb L.pdb
segment L {first NTER; last CTER; pdb L.pdb}
coordpdb L.pdb L

set chainM [atomselect top "all and chain D"]
$chainM writepdb M.pdb
segment M {first NTER; last CTER; pdb M.pdb}
coordpdb M.pdb M
# Se crean los enlaces disulfuros entre las cisteínas...
# ...en las cadenas pesadas
patch DISU K:728 K:788
patch DISU K:892 K:834
patch DISU K:667 K:611
patch DISU K:553 K:479

patch DISU H:210 H:154
patch DISU H:331 H:271
patch DISU H:96 H:22
patch DISU H:435 H:377

# ... en las cadenas ligeras
patch DISU M:1152 M:1218
patch DISU M:1324 M:1264

patch DISU L:937 L:1003
patch DISU L:1109 L:1049

# e intracatenarios
patch DISU H:230 L:1129
patch DISU K:687 M:1344

patch DISU K:693 H:236
patch DISU K:696 H:239

guesscoord
regenerate angles dihedrals

# Se generan los archivos finales
writepdb 1HZH_M_RU.pdb
writepsf 1HZH_M_RU.psf

mol delete all

mol load psf 1HZH_M_RU.psf pdb 1HZH_M_RU.pdb

```

8.5. Anexo 5: Script proteinInitialPosition.tcl

```
#####
# proteinInitialPosition.tcl
# -----
# Este script en TCL fija la posición inicial de una proteína para
# que interactúe con una superficie.
#
# Opera para realizando una exploración exhaustiva de las posibles
# orientaciones iniciales de la proteína (con una profundidad de
# búsqueda determinada) y en cada una de ellas cuenta y nombra los
# residuos que favorecen y desfavorecen la interacción con la
# superficie desde el aminoácido más cercano a ella, hasta una
# distancia dada por el usuario. Luego, fija como posición inicial más
# optima aquella en la que la operación
# "residuosQueFavorecen-residuosQueDesfavorecen" obtiene el valor más
# alto.
#
# Finalmente, genera los archivos de salida.
#
# Entradas:
# - nombre del archivo .pdb de la proteína
# - nombre del archivo .pdb de la superficie
# - distancia a la cual estará la proteína de la superficie
# - ángulo de variación de la rotación
# - distancia hasta la cual se contarán residuos (desde la
# superficie)
# - aminoácidos que desfavorecen la interacción entre la proteína y
# la superficie
# - aminoácidos que favorecen la interacción entre la proteína y la
# superficie
#
# Salidas:
# - archivo .pdb de la proteína en su nueva orientación
#
#####

# Entradas:

set proteinName "1HZH_M_RU_MD" ;# Nombre del .pdb de la proteina
set surfaceName "kaolinite_38x22_R_MD"; # el nombre del .pdb de la
superficie
set angle 15 ;# Ángulo de variación de la rotación de la proteína
set cutoff 12 ;# Distancia hasta la cual se contarán residuos
set surfProtDist 2 ;# Distancia a la cual se quiere la proteína de la
superficie
set disfavor "resname ALA or resname CYS or resname VAL or resname LEU or
resname ILE or resname MET or resname PRO or resname PHE or resname TRP or
resname GLY" ;# Aminoácidos que mantienen la estructura de la proteína
set favor "resname SER or resname THR or resname GLN or resname ASN or
resname TYR" ;# Aminoácidos que favorecen la interacción
proteina/superficie
```

```

mol delete all
mol load pdb $proteinName.pdb

set fo [open "IP_$proteinName\_angle$angle.log" w]

# Carga la proteína sobre una variable y calcula su centro
set protein [atomselect top all]
set centerProt [measure center $protein]

# Determina cual es la afinidad que tiene la proteína con la superficie en
su conformación original...
set mMProt [measure minmax $protein]
set interactDist [expr [lindex $mMProt 0 2]+$cutoff-$surfProtDist]
set numDisfavor [[atomselect top "protein and z<$interactDist and
($disfavor) and name CA"] num]
set listDisfavor [[atomselect top "protein and z<$interactDist and
($disfavor) and name CA"] list]
set numFavor [[atomselect top "protein and z<$interactDist and ($favor)
and (name ND1 or name ND2 or name NE or name NE1 or name NE2 or name NH1 or
name NH2 or name NZ or name OD1 or name OD2 or name OE1 or name OE2 or name
OG or name OG1 or name OH)"] num]
set listFavor [[atomselect top "protein and z<$interactDist and ($favor)
and (name ND1 or name ND2 or name NE or name NE1 or name NE2 or name NH1 or
name NH2 or name NZ or name OD1 or name OD2 or name OE1 or name OE2 or name
OG or name OG1 or name OH)"] list]
set maxAfinity [expr $numFavor-$numDisfavor]
set minZValue [expr [lindex $mMProt 1 2]-[lindex $mMProt 0 2]]

# ...y la fija como la máxima.
puts $fo "Los residuos que favorecen la interacción proteína-superficie son
$numFavor:"
for {set index 0} {$index<[llength $listFavor]} {incr index} {
    set zCoord [[atomselect top "index [lindex $listFavor $index]" get z]
    set zDist [expr $zCoord-[lindex $mMProt 0 2]]
    set residueName [[atomselect top "index [lindex $listFavor $index]"
get resname]
    set residueID [[atomselect top "index [lindex $listFavor $index]" get
resid]
    set atomName [[atomselect top "index [lindex $Favor $index]" get name]
    puts $fo "\t\t$residueName$residueID:$atomName que estará a $zDist de
la superficie"
}
puts $fo "\nLos residuos que desfavorecen la interacción proteína-
superficie son $numDisfavor:"
for {set index 0} {$index<[llength $listDisfavor]} {incr index} {
    set zCoord [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor $index]" get
z]
    set zDist [expr $zCoord-[lindex $mMProt 0 2]]
    set residueName [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor $index]"
get resname]
    set residueID [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor $index]"
get resid]
    set atomName [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor $index]"
get name]
    puts $fo "\t\t$residueName$residueID:$atomName que estará a $zDist de
la superficie"
}

```

```

puts $fo "\nAfinidad máxima actual: $maxAfinity en la rotación x:0, y:0,
z:0 y dimensión en z=$minZValue\n\n"
set maxLoops [expr 360/$angle]

# Luego, comienza el ciclo de exploración. Para cada $angle grados que se
gira la proteína en x...
for {set i 1} {$i<=$maxLoops} {incr i} {
    $protein move [trans center $centerProt axis x $angle]
    # ...y en y...
    for {set j 1} {$j<=$maxLoops} {incr j} {
        $protein move [trans center $centerProt axis y $angle]
        # ...se gira también en z, de $angle en $angle grados hasta alcanzar
        los 360°.
        for {set k 1} {$k<=$maxLoops} {incr k} {
            $protein move [trans center $centerProt axis z $angle]
            set mMProt [measure minmax $protein]
            set zValue [expr [lindex $mMProt 1 2]-[lindex $mMProt 0 2]]
            # Se determina nuevamente la afinidad en la nueva rotación...
            set interactDist [expr [lindex $mMProt 0 2]+$cutoff-$surfProtDist]
            set numDisfavorNext [[atomselect top "protein and z<$interactDist and
($disfavor) and name CA"] num]
            lreplace $listDisfavor 0 [llength $listDisfavor]
            set listDisfavor [[atomselect top "protein and z<$interactDist and
($disfavor) and name CA"] list]
            set numFavorNext [[atomselect top "protein and z<$interactDist and
($favor) and (name ND1 or name ND2 or name NE or name NE1 or name NE2 or
name NH1 or name NH2 or name NZ or name OD1 or name OD2 or name OE1 or name
OE2 or name OG or name OG1 or name OH)"] num]
            lreplace $listDisfavor 0 [llength $listFavor]
            set listFavor [[atomselect top "protein and z<$interactDist and
($favor) and (name ND1 or name ND2 or name NE or name NE1 or name NE2 or
name NH1 or name NH2 or name NZ or name OD1 or name OD2 or name OE1 or name
OE2 or name OG or name OG1 or name OH)"] list]
            set afinityNext [expr $numFavorNext-$numDisfavorNext]
            # ...y se evalúa si es mayor que la afinidad anterior. Si es más
afín, entonces se guardan los ángulos de esta rotación. El procedimiento se
repite hasta que se alcanza la rotación completa en todos los ejes.
            if {$afinityNext>$maxAfinity} {
                set maxAfinity $afinityNext
                set minZValue $zValue
                puts $fo "Los residuos que favorecen la interacción proteína-
superficie son $numFavorNext:"
                for {set index 0} {$index<[llength $listFavor]} {incr index} {
                    set zCoord [[atomselect top "index [lindex $listFavor $index]"
get z]
                    set zDist [expr $zCoord-[lindex $mMProt 0 2]]
                    set residueName [[atomselect top "index [lindex $listFavor
$index]" get resname]
                    set residueID [[atomselect top "index [lindex $listFavor
$index]" get resid]
                    set atomName [[atomselect top "index [lindex $listFavor
$index]" get name]
                    puts $fo "\t\t$residueName$residueID:$atomName que estará a
$zDist de la superficie"
                }
                puts $fo "\nLos residuos que desfavorecen la interacción proteína-
superficie son $numDisfavorNext:"

```

```

    for {set index 0} {$index<[llength $listDisfavor]} {incr index} {
        set zCoord [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor
$index]"] get z]
        set zDist [expr $zCoord-[lindex $mMProt 0 2]]
        set residueName [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor
$index]"] get resname]
        set residueID [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor
$index]"] get resid]
        set atomName [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor
$index]"] get name]
        puts $fo "\t\t$t$residueName$residueID:$atomName que estará a
$zDist de la superficie"
    }
    puts $fo "\nAfinidad máxima actual: $maxAfinity en rotación x:
[expr $angle*$i], rotación y: [expr $angle*$j], rotación z: [expr
$angle*$k] y dimensión en z=$minZValue\n\n"
    set xTurn [expr $angle*$i]
    set yTurn [expr $angle*$j]
    set zTurn [expr $angle*$k]
}
if {$afinityNext==$maxAfinity} {
    if {$zValue<$minZValue} {
        set minZValue $zValue
        puts $fo "Los residuos que favorecen la interacción proteína-
superficie son $numFavorNext:"
        for {set index 0} {$index<[llength $listFavor]} {incr index} {
            set zCoord [[atomselect top "index [lindex $listFavor $index]"]
get z]
            set zDist [expr $zCoord-[lindex $mMProt 0 2]]
            set residueName [[atomselect top "index [lindex $listFavor
$index]"] get resname]
            set residueID [[atomselect top "index [lindex $listFavor
$index]"] get resid]
            set atomName [[atomselect top "index [lindex $listFavor
$index]"] get name]
            puts $fo "\t\t$t$residueName$residueID:$atomName que estará a
$zDist de la superficie"
        }
        puts $fo "\nLos residuos que desfavorecen la interacción
proteína-superficie son $numDisfavorNext:"
        for {set index 0} {$index<[llength $listDisfavor]} {incr index} {
            set zCoord [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor
$index]"] get z]
            set zDist [expr $zCoord-[lindex $mMProt 0 2]]
            set residueName [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor
$index]"] get resname]
            set residueID [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor
$index]"] get resid]
            set atomName [[atomselect top "index [lindex $listDisfavor
$index]"] get name]
            puts $fo "\t\t$t$residueName$residueID:$atomName que estará a
$zDist de la superficie"
        }
        puts $fo "\nAfinidad máxima actual: $maxAfinity en rotación x:
[expr $angle*$i], rotación y: [expr $angle*$j], rotación z: [expr
$angle*$k] y dimensión en z=$minZValue\n\n"
        set xTurn [expr $angle*$i]
        set yTurn [expr $angle*$j]
    }
}

```

```

        set zTurn [expr $angle*$k]
    }
}
}
}

# A continuación se aplica la rotación,
mol delete all
mol load pdb $proteinName.pdb
set protein [atomselect top all]
$protein move [trans center $centerProt axis x $xTurn]
$protein move [trans center $centerProt axis y $yTurn]
$protein move [trans center $centerProt axis z $zTurn]

set mMProt [measure minmax $protein]
set centerProt [measure center $protein]

mol load pdb $surfaceName.pdb
set surface [atomselect top all]
set mMSurf [measure minmax $surface]
set centerSurf [measure center $surface]
mol delete top

# Se calcula el vector que dará a la proteína su nueva posición
set xDifference [expr [lindex $centerProt 0]-[lindex $centerSurf 0]]
set yDifference [expr [lindex $centerProt 1]-[lindex $centerSurf 1]]
set zDifference [expr [lindex $mMProt 0 2]-[lindex $mMSurf 1 2]]
set xDifference [expr $xDifference*-1]
set yDifference [expr $yDifference*-1]
set zDifferenceFinal [expr $zDifference*-1+$surfProtDist]
# y se aplica la translación
$protein moveby "$xDifference $yDifference $zDifferenceFinal"

set mMProt [measure minmax $protein]
puts $fo "\n#####"
puts $fo "Se aplicó la rotación y translación en la proteína. Los ángulos
de rotación fueron x=$xTurn, y=$yTurn y z=$zTurn, el vector de traslación
usado fue {$xDifference $yDifference $zDifferenceFinal} y la dimensión
final en z=$minZValue"
puts $fo "#####"

$protein writepdb $proteinName\_IP.pdb
mol delete all
close $fo

```

8.6. Anexo 6: *Script* restrainSurface.tcl

```
#####  
# restrainSurface.tcl #  
# -----#  
# Aplica una restricción de movimiento de k(harmonic)=1 kcal/mol a #  
# todos los átomos que componen la superficie. #  
# Entradas: #  
# - Archivo .pdb del sistema con la superficie de caolinita #  
# # #  
# Salidas: #  
# - Archivo .pdb con la restricción en sobre la superficie #  
# # #  
#####  
  
# Entradas:  
set systemName 1HZH_kaolinite_WB ; #nombre del archivo .pdb del sistema  
  
# Se aplica la restricción de movimiento a los átomos de la superficie  
mol load pdb $systemName.pdb  
set all [atomselect top all]  
$all set beta 0  
set surface [atomselect top "resname XXXX"]  
$surface set beta 1  
$all writepdb restrain.pdb
```

8.7. Anexo 7: Configuración para la DM de la superficie de caolinita en una caja de agua.

```
#####  
# surfaceMD.conf #  
#-----#  
# El siguiente script contiene la rutina de minimización y #  
# equilibración de la lámina de caolinita de 38x22x1 celdas unitarias #  
# en una caja de agua. Todos los átomos de la superficie fueron #  
# restringidos con K(harmonic)=1 kcal/mol, para una simulación con un #  
# ensamble NPT, en PBC y PME #  
# #  
# Entadas: #  
# - Archivo .pdb y .psf de la superficie en agua #  
# - Archivo del campo de fuerza INTERFACE #  
# - Archivo de restricción de movimiento de los átomos de la #  
# superficie #  
# #  
# Salidas: #  
# - archivo .dcd con la trayectoria de la dinámica molecular #  
# - archivo .log con la información de las energías en la simulación #  
# #  
#####  
  
#####  
# Parametros ajustables #  
#####  
  
structure kaolinite_3822_WB.psf  
coordinates kaolinite_3822_WB.pdb  
  
set output kaolinite_3822_WB-01  
outputName $output  
dcdfile ${output}.dcd  
xstFile ${output}.xst  
  
set temperature 298  
  
# Continuing a job from the restart files  
if {0} {  
  set inputname kaolinite_3822_WB-01  
  binCoordinates $inputname.restart.coor  
  binVelocities $inputname.restart.vel  
  extendedSystem $inputname.restart.xsc  
}  
  
firsttimestep 0 ; # step to restart  
  
#####  
# Parametros para la simulación #  
#####
```

```

# Inputs
paraTypeCharmm      on ;
parameters          charmm27_interface_v1_5.prm

# NOTE: Do not set the initial velocity temperature if you
# have also specified a .vel restart file!
temperature         $temperature

# PBC
# NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
# specified an .xsc restart file!
if {1} {
  cellBasisVector1   198.    0.    0.
  cellBasisVector2   0.    198.    0.
  cellBasisVector3   0.    0.    26.
  cellOrigin         97.36955261230469 98.6713638305664
11.565696716308594
}

wrapWater           on ; #wrap water to central cell
wrapAll             on ; #wrap all to central cell
wrapNearest        off ; #use for non-rectangular cells

#PME (long-range electrostatics interaction)
if {1} {
  PME                yes
  PMEGridSpacing     1.0
}

# Force-Field Parameters
exclude             scaled1-4
1-4scaling          1.0 ; # neglect interaction 1-2 and 1-3
cutoff              12. ; #cut-off electrostatic and vdW interactions at
this distance
switching           on ; # make smooth cut-off
switchdist          10.
pairlistdist        13.5 ; # reduced from 14 to 13.5 (try to save time!)

# Integrator Parameters
timestep            2.0 ; # 2fs/step !! Propongo bajar a 1 fs/step al
dejar libre la proteina.
rigidBonds          all ; # (needed for 2fs steps) all/water, all bonds
involving H are to be fixed
nonbondedFreq       1 ; # nonbonded forces every step
fullElectFrequency  2 ; # PME only every other step
stepspercycle       20 ; #Each cycle represents the number of timesteps
between atom reassignments.

# Constant Temperature Control
if {1} {
  langevin           on ; # do langevin dynamics
  langevinDamping     5 ; # damping coefficient (gamma) of 5/ps
  langevinTemp        $temperature
  langevinHydrogen    off ; # don't couple langevin bath to hydrogens
}

# Constant Pressure Control (variable volume)

```

```

if {1} {
  useGroupPressure      yes ; #Pressure can be calculated using hydrogen-
group based pseudo-molecular virial and kinetic energy
  useFlexibleCell       yes ; ; #no for water box, yes for membrane
  useConstantArea       no ; #keeps the dimension of the unit cell in the
x-y plane constant while allowing fluctuations along the z axis
  useConstantRatio      yes ; #keeps the ratio of the unit cell in the x-y
plane constant while allowing fluctuations along all axes

  langevinPiston        on
  langevinPistonTarget  1.01325 ;# in bar -> 1 atm
  langevinPistonPeriod  200
  langevinPistonDecay   50
  langevinPistonTemp    $temperature
}

restartfreq             10000 ;
dcdfreq                 500 ;
xstFreq                 500 ;
outputEnergies          500 ;
outputPressure          500 ;
outputTiming            500 ;

#####
# Parametros adicionales                                     #
#####

# restraint the surf atoms by means of harmonic constraint
if {1} {
  constraints           on ; # fix atoms
  constKCol             B ; #PDB column with the force constants, default
value is Beta-coupling (B)
  consref               restrain.pdb ; #PDB file to use for reference
positions for harmonic constraints.
  constKFile            restrain.pdb ; #reference.pdb; PDB file to use for
force constants for harmonic constraints.
}

#####
## Script de ejecución                                     #
#####

# Minimization
minimize                10000 ; # steps for eq0, 12500 * 2 fs/steps = 25000
fs = 25 ps ;need to be optimized!
reinitvels              $temperature
run                     5542000 ; # steps for eq1, 50000 * 2 fs/steps =
100000 fs = 100ps ; need to be optimized!

```

8.8. Anexo 8: Configuración para la DM de la IgG1 en una caja de agua.

```
#####
# proteinMD.conf
#-----#
# El siguiente script contiene la rutina de minimización, y #
# equilibración de la proteína IgG1 b12, en una caja de agua, para una #
# simulación con un ensamble NPT, en PBC y PME.
#
# Entadas:
# - Archivo .pdb y .psf de la proteína en agua
# - Archivo del campo de fuerza INTERFACE
#
# Salidas:
# - archivo .dcd con la trayectoria de la dinámica molecular
# - archivo .log con la información de las energías en la simulación
#
#####

#####
# Parametros ajustables
#####

structure          1HZH_M_RU_WB.psf
coordinates        1HZH_M_RU_WB.pdb

set output         1HZHM_RU_WB-01
outputName         $output
dcdfile            ${output}.dcd
xstFile            ${output}.xst

set temperature    298

# Continuing a job from the restart files
if {0} {
  set inputname    1HZH_RU_WB-01
  binCoordinates   $inputname.restart.coor.old
  binVelocities    $inputname.restart.vel ;# remove the "temperature"
entry if you use this!
  extendedSystem   $inputname.restart.xsc
}

firsttimestep      0

#####
# Parametros para la simulación
#####

# Input
```

```

paraTypeCharmm      on
parameters          charmm27_interface_v1_5.prm

# NOTE: Do not set the initial velocity temperature if you
# have also specified a .vel restart file!
temperature         $temperature

# Periodic Boundary Conditions
# NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
# specified an .xsc restart file!
if {1} {
  cellBasisVector1   147.    0.    0.
  cellBasisVector2   0.   139.    0.
  cellBasisVector3   0.    0.   195.
  cellOrigin          65.84661865234375 108.0138931274414
148.2589569091797
}

wrapWater           on ; #wrap water to central cell
wrapAll             on ; #wrap all to central cell

# Force-Field Parameters
exclude             scaled1-4
1-4scaling          1.0 ; # neglect interaction 1-2 and 1-3
cutoff              12. ; #cut-off electrostatic and vdW interactions at
this distance
switching           on; # make smooth cut-off
switchdist          10.
pairlistdist        13.5 ; # reduced from 14 to 13.5 (try to save time!)

# Integrator Parameters
timestep            2.0 ; # 2fs/step !! Propongo bajar a 1 fs/step al
dejar libre la proteína.
rigidBonds          all ; # (needed for 2fs steps) all/water, all bonds
involving H are to be fixed
nonbondedFreq       1 ; # nonbonded forces every step
fullElectFrequency  2 ; # PME only every other step
stepspercycle       20 ; #Each cycle represents the number of timesteps
between atom reassignments.

# PME (for full-system periodic electrostatics)
if {1} {
  PME                yes
  PMEGridSpacing     1.0
}

# Constant Temperature Control
langevin            on ;# do langevin dynamics
langevinDamping     5 ;# damping coefficient (gamma) of 5/ps
langevinTemp        $temperature

# Constant Pressure Control (variable volume)
if {1} {

```

```

    useGroupPressure      yes ;# needed for 2fs steps
    useFlexibleCell       no ;# no for water box, yes for membrane
    useConstantArea       no ;# no for water box, yes for membrane
    langevinPiston        on
    langevinPistonTarget  1.01325 ;# in bar -> 1 atm
    langevinPistonPeriod  200.
    langevinPistonDecay   50.
    langevinPistonTemp    $temperature
}

restartfreq      500
dcdfreq         500
xstFreq         500
outputEnergies  500
outputPressure  500

#####
# Parametros adicionales                                     #
#####

# Put here any custom parameters that are specific to
# this job (e.g., SMD, TclForces, etc...)

margin 3 ; # extra length in patch dimension (A)

#####
## Script de ejecución                                     #
#####

# Minimization
if {1} {
    minimize      10000
    reinitvels    $temperature ; # reinitializes velocities to a
random distribution based on the given temperature
}

run 500000 ;#

```

8.9. Anexo 9: Configuración para la DM de la IgG1 y la superficie de caolinita en una caja de agua.

```
#####
# proteinSurfaceMD.conf
#-----#
# El siguiente script contiene la rutina de minimización y #
# equilibración de la superficie de caolinita de 38x22x1 celdas #
# unitarias y la IgG1 b12 en una caja de agua. Todos los átomos de #
# la superficie fueron restringidos con K(harmonic)=1 kcal/mol, para #
# una simulación con un ensamble NPT, en PBC y PME
#
# Entadas:
# - Archivo .pdb y .psf de la caolinita y la IgG1 en agua
# - Archivo del campo de fuerza INTERFACE
# - Archivo de restricción de movimiento de los átomos de la
# superficie
#
# Salidas:
# - archivo .dcd con la trayectoria de la dinámica molecular
# - archivo .log con la información de las energías en la simulación
#
#####

#####
# Parámetros ajustables
#####

structure          1HZH_kaolinite_WB.psf
coordinates        1HZH_kaolinite_WB_corrected.pdb

set output         1HZH_kaolinite_WB-01
outputName        $output
dcdfile           ${output}.dcd
xstFile           ${output}.xst

set temperature    298

# Continuing a job from the restart files
if {0} {
  set inputname    1HZH_kaolinite_WB-01
  binCoordinates   $inputname.restart.coor.old
  binVelocities    $inputname.restart.vel ;# remove the "temperature"
entry if you use this!
  extendedSystem   $inputname.restart.xsc
}

firsttimestep     0

#####
# Parámetros para la simulación
#
```

```

#####

# Input
paraTypeCharmm      on
parameters          charmm27_interface_v1_5.prm

# NOTE: Do not set the initial velocity temperature if you
# have also specified a .vel restart file!
temperature          $temperature

# Periodic Boundary Conditions
# NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
# specified an .xsc restart file!
if {1} {
  cellBasisVector1   198.    0.    0.
  cellBasisVector2   0.   198.    0.
  cellBasisVector3   0.    0.   155.
  cellOrigin          97.52257537841797 98.71808624267578
76.20189666748047
}

wrapWater           on ; #wrap water to central cell
wrapAll             on ; #wrap all to central cell

# Force-Field Parameters
exclude             scaled1-4
1-4scaling          1.0 ; # neglect interaction 1-2 and 1-3
cutoff              12. ; #cut-off electrostatic and vdW interactions at
this distance
switching           on; # make smooth cut-off
switchdist          10.
pairlistdist        13.5 ; # reduced from 14 to 13.5 (try to save time!)

# Integrator Parameters
timestep            2.0 ; # 2fs/step !! Propongo bajar a 1 fs/step al
dejar libre la proteina.
rigidBonds          all ; # (needed for 2fs steps) all/water, all bonds
involving H are to be fixed
nonbondedFreq       1 ; # nonbonded forces every step
fullElectFrequency  2 ; # PME only every other step
stepspercycle       20 ; #Each cycle represents the number of timesteps
between atom reassignments.

#PME (for full-system periodic electrostatics)
if {1} {
  PME                yes ; # Use particle mesh Ewald for
electrostatics?
  PMEGridSpacing     1.0 ; # maximum space between grid points
}

# Constant Temperature Control
langevin            on ; # do langevin dynamics
langevinDamping     5 ; # damping coefficient (gamma) of 5/ps

```

```

langevinTemp          $temperature

# Constant Pressure Control (variable volume)
if {1} {
  useGroupPressure    yes ; # needed for 2fs steps
  useFlexibleCell     yes ; # no for water box, yes for membrane
  useConstantArea     no ; # no for water box, yes for membrane
  useConstantRatio    yes;

  langevinPiston      on
  langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
  langevinPistonPeriod 200.
  langevinPistonDecay 50.
  langevinPistonTemp  $temperature
}

restartfreq           500
dcdfreq              500
xstFreq              500
outputEnergies       500
outputPressure        500

#####
# Parámetros adicionales #
#####

# Put here any custom parameters that are specific to
# this job (e.g., SMD, TclForces, etc...)

margin 3

if {1} {
  constraints          on
  consRef              restrain.pdb
  consKFile            restrain.pdb
  consKCol             B
}

#####
## Script de ejecución #
#####

# Minimization
if {1} {
  minimize             10000
  reinitvels          $temperature
}

run 500000

```