

APROXIMACIÓN TEÓRICA AL ENTENDIMIENTO DE LOS FENÓMENOS DE
NUCLEACIÓN DE LA β 2-MICROGLOBULINA

JORGE RICARDO QUINTERO SAUMETH
Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FÍSICOQUÍMICA TEÓRICA Y
EXPERIMENTAL
BUCARAMANGA, 2011

APROXIMACIÓN TEÓRICA AL ENTENDIMIENTO DE LOS FENÓMENOS DE
NUCLEACIÓN DE LA β 2-MICROGLOBULINA

JORGE RICARDO QUINTERO SAUMETH

Trabajo de investigación para optar al título de:
Magíster en Química

Director de la investigación
CRISTIAN BLANCO TIRADO
Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FISCOQUÍMICA TEÓRICA Y
EXPERIMENTAL
BUCARAMANGA, 2011

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar esta oportunidad para expresar mis agradecimientos a todas las personas que de una u otra manera ofrecieron su grano de arena para culminar exitosamente esta etapa de mi formación personal y profesional.

Primero que todo agradecer a mi director de trabajo, el Profesor Cristian Blanco, por brindarme nuevamente la oportunidad de continuar mis estudios académicos lo cual me permitió fortalecerme en muchos aspectos tanto en lo profesional como lo personal.

A mi esposa que tanto amo. Este párrafo no será suficiente para expresar toda mi admiración que tengo hacia ella. Sus fortalezas y debilidades, su lagrimas y sonrisas, sus oraciones y reclamos me dieron la suficiente fuerza para lograr este meta. También le agradezco a mi cora bella por regalarme mis dos grandes felicidades: Miguel Ángel y María Azucena Quintero Rodríguez.

También quiero agradecer a la familia Rodríguez Serrano; a doña Carla y don Jaime por todo su apoyo que me han brindado durante estos últimos cinco años. A Natica no faltaba más. A la profesora Martha Cecilia Daza Espinosa quiero agradecerle toda su inmensa y desinteresada colaboración que me brindó como jurada de mi tesis y a quien considero una gran amiga.

A mis amigos quienes hicieron parte del Grupo de Investigación en Físicoquímica Teórica y Experimental (GIFTEX) con quienes tuve la oportunidad de compartir momentos agradables.

*Este trabajo es dedicado a
mis tres amores:
Angela Susana, Miguel Ángel y María Azucena*

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	16
2. Estado del arte	19
2.1 Formación de depósitos amiloides $\beta 2M$	19
2.1.1 Generalidades	19
2.1.2 Características estructurales	21
2.1.3 Mecanismos de formación	25
2.1.3.1 Formación de fibras $\beta 2m$ a pH ácido	26
2.1.3.2 Formación de fibras $\beta 2m$ a pH neutro	29
2.1.3.3 Estudios teóricos relacionados con la estructura y formación de fibras amiloides de $\beta 2m$	36
2.2 Conclusiones del estado del arte	38
3. Objetivos	39
3.1 Objetivo general	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. Metodología	40
4.1 Obtención de las energías de contacto $\beta 2m$ - $\beta 2m$	40
4.2 Dinámica de la asociación de la proteína $\beta 2m$	44
4.2.1 Modelo de Ising	45
4.2.2 Método de Metropolis	45
4.2.3 Desarrollo del algoritmo computacional	46
4.2.4 Simulaciones de la dinámica de asociación de monómeros de $\beta 2m$	54

5. Resultados	55
5.1 Energías de contacto $\beta 2m-\beta 2m$	55
5.1.1 Descripción de las interacciones: perfiles de energía de interacción entre dos monómeros de $\beta 2m$	56
5.1.1.1 Contactos 1:1	57
5.1.1.2 Contactos 1:2	58
5.1.1.3 Contactos 1:3 y 1:5	58
5.1.1.4 Otros contactos	59
5.2 Formación de depósitos amiloides $\beta 2m$	62
5.2.1 Distribución de energía y número de contactos	63
5.2.2 Velocidad de formación de intermediarios oligoméricos	69
5.2.3 Tiempo de latencia en función de la temperatura y la concentración	74
5.2.4 Formación y distribución de oligómeros intermedios	78
5.2.5 Morfología de los depósitos amiloides de $\beta 2m$	84
6. Conclusiones	90
7. Referencias bibliográficas	92
8. Anexos	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras del CMH-I y la $\beta 2m$ humana.	20
Figura 2. Modelo representativo de las fibras amiloides	21
Figura 3. Características estructurales de las protofibras	22
Figura 4. Modelo representativo de las fibras tipo I,II y III	23
Figura 5. Modelo representativo de las fibras tipo I,II y III	24
Figura 6. Modelo de formación de fibras $\beta 2m$ a pH ácido	27
Figura 7. Modelo de formación de fibras $\beta 2m$ propuesto por Vachet <i>et al.</i>	30
Figura 8. Estructura tridimensional de la P32A comparada con la $\beta 2m$ nativa	32
Figura 9. Estructura tridimensional del dímero P32A	32
Figura 10. Estructura tridimensional de oligómeros intermedios de H13F	33
Figura 11. Dímeros de H13F y cambios conformacionales	34
Figura 12. Asignación de puntos de contacto en la proteína $\beta 2m$	42
Figura 13. Modelos simplificados de los distintos contactos generados entre dos proteínas $\beta 2m$	43
Figura 14. Construcción de los perfiles de energía de la interacción entre dos proteínas $\beta 2m$	44
Figura 15. Construcción de vectores para determinar el tipo de orientación entre cada par de proteínas $\beta 2m$	49
Figura 16. Ejemplo del archivo de matriz de datos para los cinco puntos de contacto.	50
Figura 17. Ejemplo de los tipos de movimientos que se pueden generar en cada simulación.	51
Figura 18. Diagrama de flujo del programa de simulación <i>Gising.exe</i>	52
Figura 19. Representaciones simplificadas de los contactos 1:1	55

Figura 20. Comparación estructural de la $\beta 2m$ de tipo libre y complejo con la encontrada en el CMH-I	56
Figura 21. Orientaciones de tipo 1:1_5	57
Figura 22. Orientaciones de tipo 1:2_1	58
Figura 23. Orientaciones de tipo 2:2_1, 2:4_1 y 4:4_1	59
Figura 24. Orientaciones de tipo 5:5_3	60
Figura 25. Comparación estructural entre los dímeros H13F y 5:5_3 ($\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$)	61
Figura 26. Energía total y número de contactos para las simulaciones de dinámica	64
Figura 27. Resultados de la primera derivada de la energía para los distintos casos de N a una temperatura de 310 K.	65
Figura 28. Valores de energía total de las simulaciones de dinámica a diferentes condiciones de temperatura y número de monómeros por celda	67
Figura 29. Valores obtenidos del número de contactos empleando diferentes temperaturas y cantidad de monómeros	68
Figura 30. Gráfica de la cantidad de monómeros de $\beta 2m$ involucrados en la formación de los intermediarios oligoméricos para los distintos casos de N a 310 K y 700 K	69
Figura 31. Resultados de la velocidad inicial de asociación de monómeros de $\beta 2m$ en función de la concentración y al temperatura	70
Figura 32. Esquema propuesto por Miranker <i>et al.</i> para la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$ en presencia de cobre y bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura.	72
Figura 33. Resultados de la dependencia de la velocidad inicial de formación de oligómeros intermedios con la temperatura	73
Figura 34. Resultados del tiempo de latencia en función de la concentración y la temperatura obtenidas para las simulaciones de dinámica	76

Figura 35. Resultados obtenidos de la distribución de oligómeros intermediarios en diferentes ciclos de simulación para los distintos valores de N y a 310 K de temperatura	79
Figura 36. Resultados obtenidos de los porcentajes de abundancia de los diferentes oligómeros intermedios para los distintos casos de N y 310 K de temperatura	81
Figura 37. Resultados de los porcentajes de distribución de las dos clases de proteínas $\beta 2m$ ($\beta 2m_L$ y $\beta 2m_{Cu}$) para $N = 600$ y distintos valores de temperatura	82
Figura 38. Perfiles de distribución de oligómeros intermedios para $N = 600$ en función de la temperatura	83
Figura 39. Imágenes tridimensionales de la evolución de las simulaciones de dinámica para distintos ciclos de simulación (ciclos $MC \times 10^3$) para $N = 50$ y 310 K de temperatura	84
Figura 40. Imágenes tridimensionales de la evolución de las simulaciones de dinámica para las diez simulaciones independientes de $N = 50$ y 310 K de temperatura	85
Figura 41. Imágenes tridimensionales de la formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$ para los distintos casos de N y 310 K de temperatura	86
Figura 42. Imágenes tridimensionales de la evolución de la dinámica de formación de oligómeros intermedios en la etapa de iniciación para $N = 600$ y 310 K de temperatura	87
Figura 43. Imágenes tridimensionales de la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$ para los distintos casos de N y 310 K de temperatura	88
Figura 44. Imágenes tridimensionales de la evolución de las simulaciones de dinámica para distintos ciclos de simulación (ciclos $MC \times 10^3$) para $N = 400$ y 310 K de temperatura para la obtención de fibras amiloides de $\beta 2m$	89
Figura 45. Perfiles de energía de las interacciones $\beta 2m_L - \beta 2m_L$	119
Figura 46. Perfiles de energía de las interacciones $\beta 2m_C - \beta 2m_C$	120
Figura 47. Perfiles de energía de las interacciones $\beta 2m_L - \beta 2m_C$	121

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de energías para las interacciones $\beta 2m_L-\beta 2m_L$	122
Tabla 2. Parámetros de energías para las interacciones $\beta 2m_C-\beta 2m_C$	123
Tabla 3. Parámetros de energías para las interacciones $\beta 2m_C-\beta 2m_C$	124
Tabla 4. Distancias de equilibrio para las interacciones $\beta 2m_L-\beta 2m_L$	125
Tabla 5. Distancias de equilibrio para las interacciones $\beta 2m_C-\beta 2m_C$	125
Tabla 6. Distancias de equilibrio para las interacciones $\beta 2m_C-\beta 2m_L$	125

ABREVIATURAS

β2m	Proteína β -Microglobulina
IRC	Insuficiencia renal crónica
CMH-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
AAD	Amiloidosis asociada a diálisis
pH	Potencial de hidrógeno
DRX	Espectroscopía de difracción de Rayos X
RMN	Resonancia magnética nuclear
MFA	Microscopía de fuerza atómica
EM	Espectrometría de masas
aa	Aminoácido
His	Histidina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ala	Alanina
T	Temperatura (Unidades Kelvin)
k_B	Constante de Boltzmann
V	Volúmen

RESUMEN

TITULO: APROXIMACIÓN TEÓRICA AL ENTENDIMIENTO DE LOS FENÓMENOS DE NUCLEACIÓN DE LA β 2-MICROGLOBULINA*

AUTOR: JORGE RICARDO QUINTERO SAUMETH†

PALABRAS CLAVES: β 2-microglobulina, fibras amiloide, modelo de Ising, algoritmo de Metropolis, nucleación.

DESCRIPCIÓN:

En pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a diálisis ocurre la formación de depósitos amiloides y cuya proteína que los constituyen es la β 2-microglobulina (β 2m). En este sentido, numerosos estudios han sido dirigidos para explicar la formación de estos materiales proteicos. Sin embargo, las causas por las cuales se produce la amiloidogénesis β 2m *in vivo* no son completamente claras. Por tal motivo la mayoría de estos estudios han sido desarrollados *in vitro* y teniendo en cuenta las condiciones fisiológicas de estos pacientes. Estudios *in vitro* han permitido identificar algunos factores involucrados en la obtención de estos materiales, siendo el cobre un agente facilitador durante la asociación de monómeros de β 2m que conllevan a la formación de fibras de β 2m. Adicionalmente, algunos trabajos de investigación señalan que las etapas previas a la formación de las fibras amiloides β 2m corresponden a la formación de intermedios oligoméricos de tamaño par (dímeros, tetrámeros y hexámeros). A pesar del enorme esfuerzo que la comunidad científica ha realizado para comprender estos procesos, aún no existe un modelo completo que describa la amiloidogénesis β 2m.

En este trabajo de investigación se desarrolló una metodología para brindar una descripción aproximada acerca de la manera como se forman las fibras amiloides de β 2m. En este sentido, dos etapas fueron desarrolladas satisfactoriamente. La primera etapa correspondió a la construcción de los perfiles de energía correspondientes a las interacciones entre dos monómeros de β 2m empleando un modelo de grano grueso, teniendo en cuenta cinco puntos estructurales de la proteína β 2m. En la segunda etapa, se diseñó un modelo teórico-computacional para analizar la dinámica de formación de depósitos amiloides de β 2m. Para este último, correspondiente al esquema de muestreo, se emplearon tanto el modelo de Ising como el algoritmo de Metropolis.

*Trabajo de investigación

†Facultad de Ciencias. Posgrado en Química. Director: Prof. Cristian Blanco Tirado.

SUMMARY

TITLE: THEORETICAL APPROACH OF THE β 2-MICROGLOBULIN NUCLEATION PHENOMENON UNDERSTANDING[‡]

AUTHOR: JORGE RICARDO QUINTERO SAUMETH[§]

KEYWORDS: β 2-microglobulin, amyloid fibers, Ising model, Metropolis method, nucleation.

DESCRIPCIÓN:

Patients with chronic renal failure undergoing long-term dialysis treatment arise amyloid fibrils consisting primarily of the β 2-microglobulin (β 2m) protein. This phenomena happens when membrane dializator contacts with the bloodstream. In this sense, numerous researches have been developed to explain the formation of these materials. However, the exact factors that cause β 2m fibril formation in vivo are unknown. For this reason, most studies in vitro have been developed taking into account the physiological conditions of these patients. In vitro studies suggest identification some factors, such as the presence of copper as a β 2m amyloid fibers trigger. Moreover, β 2m amyloid deposit is preceded by discrete oligomeric intermediates (dimers, tetramers and hexamers). Despite the great effort that the scientific community have been made to understand these processes, there is not a complete molecular model to describe the β 2m fibers formation.

In this work a two-stage methodology was developed successfully to present an approach on the formation of β 2m amyloid fibrils. The first one involved the potential energy surface construction for all possible interactions between two β 2m monomers employing a coarse-grained model and taking into account five points in each β 2m protein. in the second stage, an in-house fortran code was developed to analyze the β 2m amyloid deposits formation. In this case, both Ising model and Metropolis algorithm were employed.

[‡]Research work

[§]Science Faculty. Chemical Postgraduate. Adviser: Prof. Cristian Blanco Tirado.

1. INTRODUCCIÓN

La β 2-Microglobulina (β 2m) es un proteína de cadena ligera que hace parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I) [1, 2]. Debido a su similitud estructural con las inmunoglobulinas, se cree que la β 2m está involucrada en muchos procesos del sistema inmune. En pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) sometidos a diálisis los niveles de β 2m son elevados [3, 4]. Aunque su etiología no es completamente clara, Getyo *et al.* sugieren que el contacto repetido entre la membrana del dializador y la sangre desencadena la liberación excesiva de proteínas de β 2m, como respuesta del sistema inmunológico [5, 6].

Aunque la β 2m es liberada del CMH-I y catabolizada por los riñones de manera natural, cuya concentración varía entre 1 - 4 mg/L, en pacientes con IRC se presenta una acumulación de esta proteína en el torrente sanguíneo, alcanzando hasta 60 veces su concentración normal [3]. Como consecuencia, la β 2m logra asociarse y formar depósitos amiloides resistentes a la digestión proteolítica. Esta condición es conocida como amiloidosis asociada a diálisis (AAD).

La formación de estos materiales proteicos no sólo depende de su concentración sino también de otros factores como el pH, la temperatura y la presencia de metales [7–19]. Los depósitos amiloides no sólo se observan en la IRC; existen otras enfermedades como la diabetes tipo II, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y Alzheimer donde ocurre el mismo fenómeno pero se diferencian por la proteína que los constituyen [20–23].

En la última década los depósitos amiloides de β 2m han ganado gran importancia principalmente en la comprensión de sus características estructurales y en la manera como

se forman. Esto ha sido un reto científico que aún no ha sido completamente descrito. Sin embargo, el desarrollo de técnicas analíticas como la difracción de rayos X (DRX), resonancia magnética nuclear (RNM), microscopía de fuerza atómica (MFA), entre otras, han proporcionado nueva información acerca de las características estructurales de estos materiales indicando que presentan un alto grado de complejidad estructural [24–27]. Estos materiales se constituyen básicamente de asociaciones de $\beta 2m$ mediante interacciones no-covalentes formando hebras- β [27].

Aunque los factores que causan la formación *in vivo* de fibras amiloides $\beta 2m$ no son conocidos, existen diferentes alternativas que permiten generar estos materiales *in vitro*: a) formación de fibras amiloides bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 3.6$) [8, 28], b) eliminación de los primeros 6 aminoácidos *N*-terminales de la $\beta 2m$ a pH neutro [7] y c) incorporación de metales de transición bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura [9]. Este último resulta ser el de mayor impacto en cuanto a la comprensión de este fenómeno, siendo el cobre el principal agente facilitador de la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$. Miranker *et al.* sostienen que el cobre juega, definitivamente, un rol importante en estos procesos [9, 29].

Infortunadamente la elucidación estructural de intermediarios oligoméricos ha sido una tarea difícil. Miranker *et al.* han logrado hasta el momento aislar y caracterizar dos tipos de oligómeros de $\beta 2m$. El primero lo obtuvieron como resultado de la mutación del aminoácido (aa) His13 por Phe, logrando así caracterizar estructuralmente la formación de un dímero [30]. El segundo intermedio lo obtuvieron mediante la mutación del residuo de aa Pro32 por Ala, obteniendo un hexámero [31]. Adicionalmente, Vachet *et al.* aislaron y caracterizaron un oligómero constituido por dos unidades de $\beta 2m$ en estado nativo y a condiciones fisiológicas [32]. Sin embargo, los detalles acerca de la dinámica de la formación de fibras $\beta 2m$ no son completamente claros.

Con base en lo expuesto anteriormente, se construyó un modelo computacional que permitiera brindar una descripción aproximada acerca de la manera como se forman la

fibras amiloides de la proteína $\beta 2m$. Para lograr este modelo, dos etapas fueron desarrolladas satisfactoriamente. En la primera etapa se obtuvieron los perfiles de energía correspondientes a las interacciones entre dos monómeros de $\beta 2m$. A partir de estos perfiles de energía, se diseñó un modelo de grano grueso para relacionar la energía en función de la orientación de cada monómero en el dímero. En la segunda etapa se desarrolló un algoritmo computacional para analizar la formación de depósitos amiloides. En este caso se empleó el método de Ising para considerar únicamente interacciones entre pares de monómeros vecinales para poder reducir el costo computacional. La dinámica de asociación de monómeros de $\beta 2m$ fue llevada a cabo usando el algoritmo de Metropolis.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la capacidad que ofrece la implementación de modelos teóricos basados en campos de fuerza de grano grueso para calcular la energía de interacción entre pares de monómeros de $\beta 2m$ vecinales en un sistema constituido por grandes cantidades de proteínas de $\beta 2m$ (50-800 monómeros). Bajo el contexto de la dinámica de la formación de agregados de proteínas de $\beta 2m$ se logró obtener información acerca de las primeras etapas de la formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$ que correspondieron a la formación de oligómeros intermedios mediados por procesos de difusión, adsorción y desorción hasta alcanzar agregados moleculares presentando una distribución amorfa. Adicionalmente se pudo demostrar la dependencia tanto de la velocidad inicial de asociación de monómeros de $\beta 2m$ como el tiempo de latencia en función de la temperatura y concentración de la proteína $\beta 2m$ para todas las simulaciones llevadas a cabo.

Cabe destacar que este trabajo de investigación fue desarrollado gracias al apoyo financiero brindado por Colciencias, a través del proyecto "*Bases moleculares de la Amiloidosis Inducida por Diálisis*" (Contrato N° 273-2008).

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 FORMACIÓN DE DEPÓSITOS AMILOIDES β 2M

2.1.1 Generalidades

La β 2m humana es una proteína necesaria para la expresión del CMH-I presente en la superficie de todas las células nucleadas [1, 2]. Este complejo es un tipo de gen presente en el cromosoma 6 y es sintetizado a partir de un conjunto de proteínas citosólicas, las cuales son formadas mediante proteólisis protosomal [33]. La función principal del CMH-I es transportar péptidos antígenos a los linfocitos tipo T, los cuales son responsables de la respuesta inmune específica ante el patógeno involucrado en la producción del antígeno [33–35].

En su estado natural, la β 2m es formada por 99 residuos de aa los cuales forman 7 hebras β que son estabilizadas mediante un puente disulfuro formado entre los residuos de aa Cys25 y Cys80 (ver Figura 1). Adicionalmente presenta dos hojas β ; la primera formada por las hebras A,B,D,E y la segunda hoja formada por las hebras C,F,G [36–38].

In vivo la β 2m es liberada del CMH-I hacia el torrente sanguíneo, y es transportada hasta los riñones donde es degradada hasta un 95% por filtración glomerular, reabsorción tubular y proteólisis intracelular [3, 39]. El restante 5% de la β 2m es eliminada a través de mecanismos no conocidos. La síntesis de β 2m varía entre 2 a 4 mg/kg por día y esta proteína tiene un tiempo de vida media de 2.5 horas. La concentración normal de β 2m en la sangre es de 2.4 - 3.7 mg/L [40].

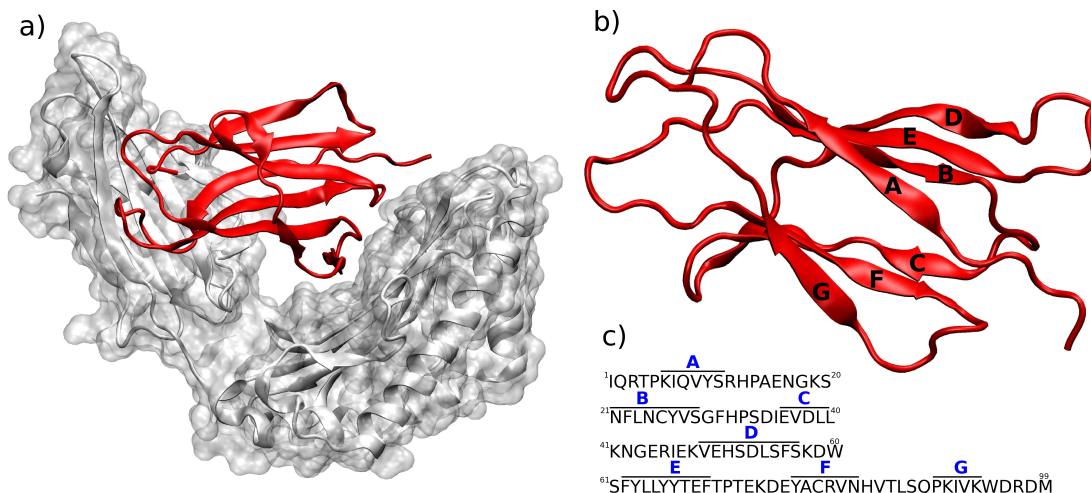


Figura 1. a) Estructura del CMH-I (PDB 1DUZ), formada por una cadena pesada α (color gris) y la β 2m (color rojo). b) Estructura de la β 2m (PDB 1JNJ) donde se muestran las 7 hebras β , A-G, que conforman su estructura secundaria. c) Secuencia de aa de la β 2m, las líneas superiores en color negro agrupan los residuos de aa que forman las diferentes hebras β .

Cuando un paciente presenta pérdida de las funciones renales, normalmente es sometido a tratamientos de diálisis. Algunos autores sugieren que durante este proceso el contacto repetido entre la membrana artificial y la sangre inducen la liberación de β 2m, como respuesta del sistema inmune [5, 6]. Por consiguiente la β 2m alcanza hasta 60 veces su concentración normal, facilitando la formación de depósitos amiloides β 2m que se acumulan en el tejido osteoarticular [3]. Esta enfermedad se conoce como amiloidosis asociada a diálisis (AAD) y su manifestación clínica se desarrolla generalmente después de varios años en pacientes sometidos a diálisis e incluyen el síndrome del túnel carpiano, artropatía degenerativa y quistes a nivel óseo provocando fracturas [3, 41, 42].

La remoción de β 2m en la sangre de pacientes con insuficiencia renal crónica ha sido mejorada por el uso de otras alternativas como la diálisis peritoneal ambulatoria continua, hemofiltración y membranas dializadoras de elevado flujo (MDEF) [43–50]. Estudios demuestran que una sesión de hemodiálisis empleando MDEF reduce hasta en un 50% los niveles de β 2m en sangre [51–53]. Por tal motivo, el desarrollo de nuevas

membranas dializadoras mejorando su biocompatibilidad, capacidad de exclusión de impurezas y tamaño del poro es una de las alternativas que en la actualidad sigue vigente.

2.1.2 Características estructurales

La elucidación estructural a escala atómica de los depósitos amiloides es un desafío tecnológico que hasta el momento no ha sido resuelto. Actualmente, existen diversas técnicas analíticas que brindan, **grosso modo**, información sobre la manera como están organizadas. Todos los depósitos amiloides que han sido estudiados hasta el momento presentan propiedades en común. Básicamente los depósitos amiloides constan de dos componentes: 5% del componente P que deriva de una glicoproteína plasmática, de síntesis hepática, y un 95% de material fibroso conformado por proteínas que difieren de acuerdo con la enfermedad de origen [54–57].

Las fibras amiloides pueden ser identificadas mediante la tinción con rojo de Congo y posteriormente al examinarlas bajo la luz polarizada. Mediante este tipo de reconocimiento histológico, diversos autores han encontrado que las fibras amiloides presentan un alto grado de ordenamiento estructural [8, 28, 58, 59]. Esta idea es confirmada usando técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (MET) y la microscopía de fuerza atómica (MFA) los cuales brindan información acerca de la morfología de las fibras amiloides [59–63].

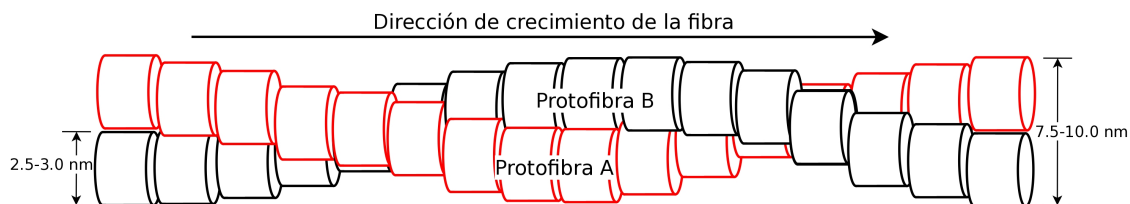


Figura 2. Representación esquemática de una fibra amiloide formada por dos protofibras.

Los resultados reportados por Radford *et al.* y Nilsson *et al.* utilizando MET y MFA muestran que las fibras amiloides presentan un diámetro de 7.5 - 10 nm y hasta 600

nm de longitud. A su vez, están formadas por protofibras de 2.5 - 3.5 nm diámetro [28, 58]. Cada protofibra consta de diferentes subunidades (subprotofibras) formadas por unidades proteínicas (entre 4 y 6 monómeros) que se organizan a través de interacciones no-covalentes alrededor del eje de crecimiento de cada protofibra [28, 58]. Adicionalmente se ha observado que cada una de las protofibras se asocian formando una estructura cross- β , también conocida como estructura helicoidal (ver Figura 2).

Información más detallada acerca de la estructura de las protofibras puede obtenerse mediante el uso de la DRX [8, 27, 64–66]. Mediante esta técnica se reporta nuevamente un ordenamiento estructural común en estos materiales. Los patrones de DRX de fibras amiloides se caracterizan por la aparición de dos señales bien definidas. La primera señal es originada por las reflexiones sobre la línea meridional entre 4.7 - 4.8 Å y corresponde a la distancia entre cada hebra β que se propagan transversalmente al eje de crecimiento de la protofibra. Es decir, cada hebra gira entre $0^\circ - 30^\circ$ formando una estructura cross- β . La segunda señal corresponde a las reflexiones en la línea ecuatorial entre 10 - 12 Å y representa la distancia entre cada hoja β ordenadas perpendicularmente al eje de la protofibra (ver Figura 3).

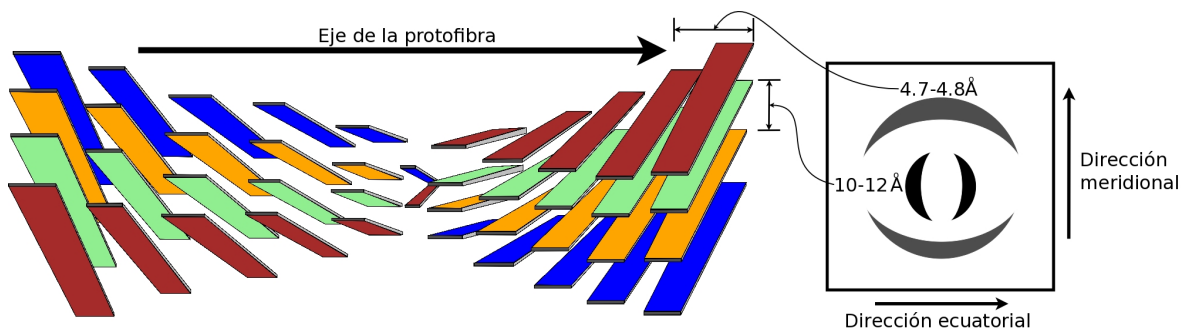


Figura 3. Características estructurales de la protofibras y patrón de DRX de las fibras amiloides. *Imagen izquierda:* representación de una subprotofibras formada por cuatro hojas β que forman una estructura helicoidal. *Imagen derecha:* patrón de DRX de las fibras amiloides.

En el caso particular de las fibras β 2m, Radford *et al.* han logrado identificar, *in vitro*, dos tipos de morfologías bajo diferentes condiciones de síntesis. La primera clase, denominadas tipo A, son formadas a un pH de 3.6 y en una solución 0.4 M de NaCl [8].

Este tipo de fibras se caracterizan por ser de cadena corta ($< 600\text{nm}$), flexibles (forma de lombriz) y exhiben una morfología nodular que se repite cada 30 nm y $\sim 3.5\text{ nm}$ de diámetro (ver Figura 4a).

La segunda clase de fibras $\beta 2\text{m}$ son formadas a $\text{pH } 2.5$ y en una solución $< 30\text{ mM}$ de NaCl [28, 62, 63, 67]. Esta última, presentan tres tipos distintos de morfología denominadas I, II, y III y la principal característica es que presentan una estructura rígida, alargadas y altamente organizadas. Las fibras de tipo I se formada por dos protofibras que se unen formando una estructura helicoidal, cuyo giro se repite cada 60 nm (ver Figura 4b). Las fibras de tipo II son formadas por dos fibras tipo I que se enrollan entre sí, formando una estructura helicoidal y presentan la misma distancia de repetición de 60 nm (ver Figura 4c). Las fibras de tipo III son formadas ya sean por cuatro protofibras que se asocian lateralmente formando una estructura helicoidal que se repite cada 70 nm [62] (ver Figura 4d) o por seis protofilamentos generando igualmente una estructura de hélice y cuyo giro se repite entre $120\text{-}185\text{ nm}$ (ver Figura 5).

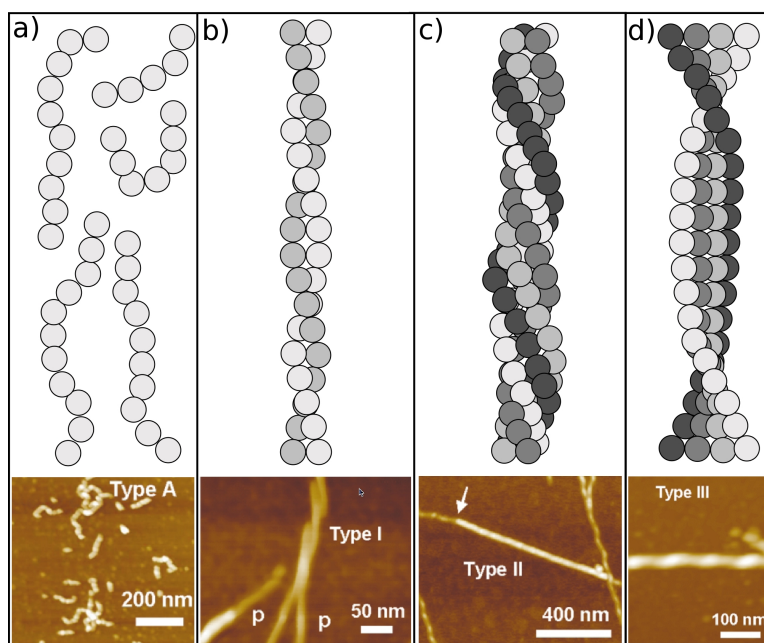


Figura 4. Modelo representativo de las fibras tipo I,II y III e imágenes MFA

Para el caso de las fibras de tipo III compuesta por seis protofilamentos, estudios mediante criomicroscopía electrónica han permitido obtener imágenes tridimensionales acerca de la disposición espacial (ver Figura 5a) y la constitución de dichas fibras (ver Figura 5b). Los resultados sugieren que cada uno de los protofilamentos involucrados en estas fibras se forman a través de asociaciones dímero-dímero de proteínas de $\beta 2m$, las cuales se orientan perpendicularmente a la dirección de crecimiento de cada protofilamento (ver Figura 5b). Otro aspecto interesante de este tipo de fibras de $\beta 2m$, y en contraste con las observadas en las fibras de tipo I, II y III (formadas por cuatro protofilamentos), es que se forman dos medias lunas cada una de ellas formadas por tres protofilamentos las cuales se enrollan generando una estructura helicoidal como se mencionó anteriormente. Sin embargo, los detalles a nivel atómico de la disposición espacial de cada proteína $\beta 2m$ en los diferentes dímeros formados no es completamente clara.

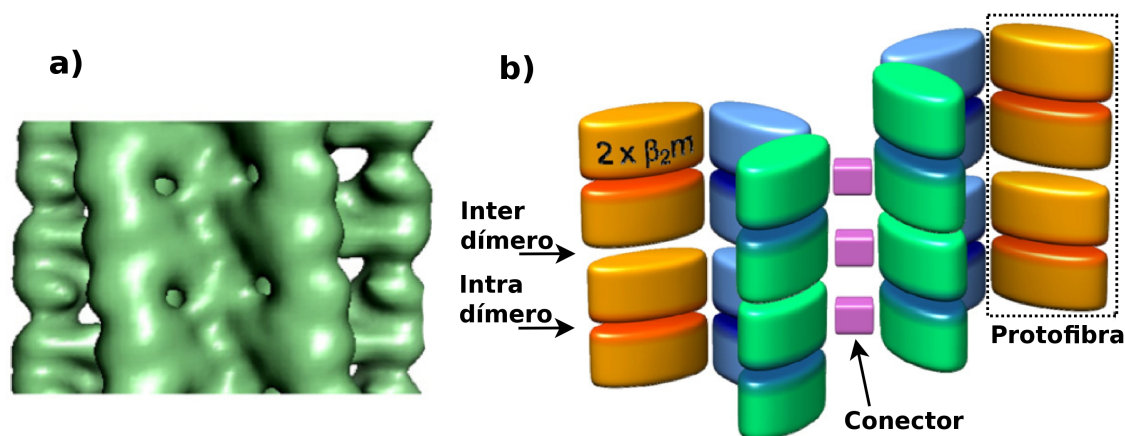


Figura 5. Modelo representativo de las fibras tipo I,II y III e imágenes MFA

Por otro lado, Goto *et al.* realizaron un estudio empleando espectroscopía infrarroja, Raman y dicroísmo circular, para caracterizar las distintas morfologías de fibras $\beta 2m$ [68]. Sus resultados sugieren que la obtención de las diferentes clases de fibras $\beta 2m$ obedecen principalmente al comportamiento de los grupos carboxílicos, ligados a las cadenas laterales de cada proteína $\beta 2m$, en función del pH y la fuerza iónica. Aunque el contenido de hojas β es similar en ambas clases de fibras (47% en las de tipo A y 53% en las de tipo I, II y III), la forma desprotonada (COO^-) predomina en fibras $\beta 2m$ de

tipo A; mientras que la forma protonada (COOH) predomina en las fibras de tipo I, II y III [68].

A pesar que las fibras $\beta 2m$ presentan diversos tipos de morfologías, a condiciones específicas de síntesis, todas ellas comparten las mismas propiedades como la birrefringencia de la luz polarizada cuando son teñidas con rojo de Congo y patrones de DRX que muestran una estructura cross- β en todas las protofibras que las conforman [62, 63].

2.1.3 Mecanismos de formación

En pacientes sometidos a diálisis se observa la formación de fibras amiloides $\beta 2m$ [3–6]. Sin embargo, el mecanismo por el cual se origina estos materiales, *in vivo*, aún se desconoce. Por tal razón, numerosos autores han realizado extensos estudios *in vitro* para identificar los factores involucrados en la fibrilogénesis de la $\beta 2m$.

Hasta el momento se conocen en detalle las características estructurales de la $\beta 2m$ y algunos aspectos morfológicos de las fibras formadas a partir de esta proteína. También se conoce que el pH y la fuerza iónica cumplen un rol importante en la fibrilogénesis $\beta 2m$, ya que modulan tanto la velocidad de crecimiento como la obtención de diferentes morfologías de fibras $\beta 2m$ reportadas hasta el momento [8, 28, 62, 63, 67].

La velocidad de crecimiento de las fibras $\beta 2m$ ha sido analizada usando la espectroscopía de fluorescencia de tioflavina T (ThT) [60–62, 67–71]. Con esta técnica, la formación de fibras $\beta 2m$, y otras, es comúnmente asociada con un proceso de nucleación, mediante el cual, se determinan dos parámetros de interés: i) velocidad de crecimiento de la fibra amiloide, que es función de la intensidad de la señal de fluorescencia obtenida a 480 nm, y corresponde a la emisión de la ThT cuando esta es adsorbida por intermediarios oligoméricos y fibras amiloides. ii) Tiempo de latencia (lag time), es decir, el tiempo que transcurre hasta observar un aumento significativo de la señal de emisión ThT, indicando la aparición de intermediarios oligoméricos y finalmente las fibras amiloides. Aunque el mecanismo por el cual la ThT se adsorbe a especies intermedias y a las fibras

amiloides es desconocido, es una técnica que hasta el momento ha sido de gran utilidad en la formulación de diferentes modelos de fibrillogénesis ya que permite obtener información acerca de la cinética de este proceso.

Debido a la dificultad que se presenta al caracterizar los posibles oligómeros intermedios, aún no existe una conexión directa entre la asociación de cada proteína $\beta 2m$, la formación de protofibras y fibras amiloides de manera consecutiva, que permita comprender las bases moleculares involucradas en la fibrillogénesis de la $\beta 2m$.

2.1.3.1 Formación de fibras $\beta 2m$ a pH ácido

Como se mencionó anteriormente, dos tipos de fibras $\beta 2m$ pueden obtenerse a pH ácido y diferentes concentraciones de iones. A pH 3.6 y 0.4M de NaCl, se forman rápidamente las fibras tipo A (ver Figura 4a), que se caracterizan por presentar una estructura altamente flexible [8]. Durante la formación de este tipo de fibras $\beta 2m$, Radford *et al.* han encontrado, mediante microscopía de fuerza atómica, la formación de intermediarios oligoméricos de cadena corta rígidos, formados por seis subprotofibras aproximadamente y cuya velocidad de asociación es independiente de un proceso de nucleación (ver Figura 6) [67].

Resultados obtenidos por Radford *et al.* utilizando RMN revelan que la $\beta 2m$ adopta preferencialmente una configuración parcialmente desdoblada, debido a las hebras A, F y retención de la estructura en las hebras B, D, E y F, los cuales forman un núcleo hidrofóbico de la proteína nativa; necesario para la formación de las fibras $\beta 2m$ de tipo A [8, 72].

En contraste con las fibras de tipo A, cuando se disminuye el pH a 2.5 y en una solución <30 mM de NaCl se forman las fibras de tipo I, II y III. Radford *et al.* emplearon la microscopía de fuerza atómica y fluorescencia con Tioflavina revelando que la formación de este tipo de fibras son dependientes de nucleación [62]. Durante la fase inicial, asociada al tiempo de latencia, los autores detectaron la aparición de depósitos amorfos,

alcanzando una altura máximo de 15 nm y 320 nm de ancho. Al transcurrir el tiempo, el tamaño de estos depósitos disminuye progresivamente y simultáneamente observaron la aparición de las primeras protofibras $\beta 2m$, las cuales se asocian hasta alcanzar las tres clases de fibras mencionadas anteriormente (ver Figura 6).

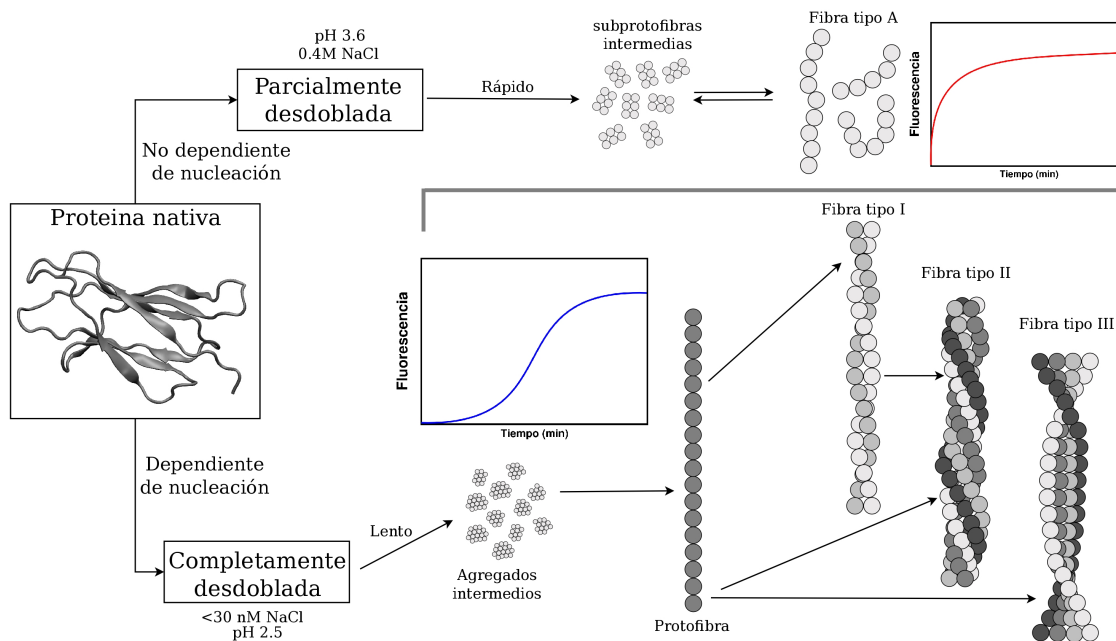


Figura 6. Modelo propuesto por Radford *et al.* para explicar la formación de fibras $\beta 2m$ a pH ácido. Formación de fibras $\beta 2m$ a pH=3.6, que conlleva la formación de fibras altamente flexibles y su crecimiento no es dependiente de nucleación. A pH=2.5 ocurre la formación de fibras $\beta 2m$ de tipo I, II y III a través de depósitos amorfos intermedios que forman cada una de las protofibras y finalmente las fibras $\beta 2m$ con un alto grado de ordenamiento estructural.

Adicionalmente, Radford *et al.* han encontrado, mediante datos de RMN, que la $\beta 2m$ adquiere una configuración altamente desdoblada, en comparación con la estructura de la $\beta 2m$ estudiada a pH=3.6 [8]. La pérdida de la estructura nativa de la $\beta 2m$ se debe principalmente a las regiones N- y C-terminal que corresponden a los residuos de aa 1-20 y 86-99 respectivamente. Aunque hasta el momento no se han obtenido la primeras imágenes de alta resolución de este tipo de fibras; estudios *in vitro* en los que se analiza el intercambio de hidrógeno mediante RMN han revelado que los N-terminales de ~ 20 residuos de aa del monómero $\beta 2m$ se encuentran principalmente desprotegidos en la fibra amiloide [8]. Los restantes aa (hebras B-F) están involucrados en la formación de una estructura hidrofóbica que es estabilizada mediante puentes de hidrógeno, necesaria

para la asociación de monómeros $\beta 2m$ y finalmente la obtención de fibras amiloides. Estos resultados son similares a los encontrados en las fibras $\beta 2m$ formadas a pH 3.6 indicando que dichos núcleos son de vital importancia en el entendimiento del proceso de formación de fibras amiloides de $\beta 2m$.

Es claro que los residuos de aa que sufren cambios conformacionales determinan la morfología de las fibras $\beta 2m$ reportadas a pH 2.5 y 3.6; mientras que las hebras B-F en cada monómero $\beta 2m$ son de vital importancia en la formación de intermediarios oligoméricos. Como consecuencia de lo anterior, algunos trabajos de investigación se han centrado en la identificación de las regiones involucradas en dicho proceso. Para determinar si existen regiones específicas dentro de la proteína $\beta 2m$ involucrada en la fibrilogénesis, han sido diseñados algunos péptidos correspondientes a diferentes estructuras dentro de la $\beta 2m$ para evaluar su capacidad para formar fibras amiloides de $\beta 2m$ [11, 12, 73, 74].

Goto *et al.* analizaron la capacidad de formar fibras amiloides sintetizando dos fragmentos peptídicos a pH 2.5. El primero, denominado K3 (residuos 20-41 de las hebras B y C) y un segundo fragmento (K7, residuos 76-91 de las hebras F y G). Sus resultados revelaron que únicamente el fragmento K3 logró formar fibras amiloides [11]. Por otra parte, Ivanova *et al.* demostraron que otras regiones de la estructura nativa de la $\beta 2m$ son capaces de formar fibras amiloides. Un fragmento peptídico (residuos 72-99 de las hebras F y G) y el segundo fragmento (83-89). Este último mostró que cada heptapéptido se ordenaban de manera anti-paralela [12, 73]. Finalmente, Radford *et al.* sugieren otra región importante en la fibrilogénesis $\beta 2m$. El fragmento 59-79 (hebras D y parte de la hebra E), mostró su capacidad para formar fibras amiloides, con retención de la configuración nativa de la $\beta 2m$ [74].

Hasta el momento es notorio que el pH y la fuerza iónica influyen significativamente sobre la formación de fibras $\beta 2m$ y algunas regiones dentro de la proteína $\beta 2m$ están directamente involucradas en la fibrilogénesis. Sin embargo, surge una pregunta im-

portante y es si existe una conexión directa entre estos resultados y los encontrados en pacientes con AAD. Algunos autores han logrado aislar fibras $\beta 2m$ formadas en el interior de las lisosimas, presentando una competencia entre formación/degradación de fibras $\beta 2m$ [75]. Es decir, luego de la disociación de la $\beta 2m$ en el CMH-I, esta proteína es absorbida por estos organelos y gracias a su ambiente de pH ácido se promueven cambios conformacionales en cada monómero $\beta 2m$ dando lugar a la formación de dichos depósitos.

2.1.3.2 Formación de fibras $\beta 2m$ a pH neutro

La característica más interesante encontrada en las fibras $\beta 2m$ es que no se forman a pH neutro y a altas concentraciones de dicha proteína [76]. Sin embargo, estos depósitos fibrosos pueden ser obtenidos ya sea mediante remoción de los primeros seis residuos de aa N-terminales a pH=7.0 [7], en presencia de colágeno a pH=6.4 [77], sonificación de $\beta 2m$ en presencia de dodecil sulfato de sodio [78] o mediante incubación de la $\beta 2m$ a condiciones cercanas a las fisiológicas y cantidades estequiométricas de iones de cobre (Cu^{+2}) [9, 29, 79]. Esta última alternativa es, en la actualidad, muy importante ya que coincide significativamente con los depósitos fibrosos de $\beta 2m$ encontrados mayoritariamente en pacientes con AAD.

Miranker y Vachet han trabajado extensamente, y de manera independiente, en el entendimiento de la formación de fibras amiloides $\beta 2m$ [9, 10, 29, 79, 80]. Teniendo en cuenta las condiciones fisiológicas de pacientes sometidos a diálisis, estos investigadores han demostrado que la fibrilogénesis asociada a diálisis ocurre satisfactoriamente en presencia de cantidades estequiométricas de Cu^{+2} . Datos de RMN reportados por Miranker *et al.* y análisis mediante espectrometría de masas publicados por Vachet *et al.* sugieren que el cobre cumple un rol determinante durante este proceso.

Varios aspectos durante la fibrilogénesis de la $\beta 2m$ han sido descritos. Inicialmente se establece que la formación de fibras amiloides $\beta 2m$ inducida por Cu^{+2} no requiere desestabilización completa de la estructura secundaria y terciaria de la proteína nativa

como ocurre a pH ácido [9]. En esta etapa, el cobre coordina preferencialmente con el aa His31 de la $\beta 2m$ para formar el complejo $\beta 2m-Cu^{+2}$ [29]. Posteriormente promueve ligeros cambios conformacionales en los residuos de aa vecinales. Bajo estas condiciones, el complejo $\beta 2m-Cu^{+2}$ forma fibras amiloides al cabo de la primera semana de incubación y durante este proceso han logrado identificar algunos intermediarios oligoméricos de tipo dímero, tetramero y hexámero, estableciéndose que la asociación de monómeros $\beta 2m$ ocurre de manera discreta [79, 80].

Adicionalmente, Vachet *et al.* proponen que la participación de iones de Cu^{+2} únicamente se observa durante la formación de dímeros y tetrameros; mientras que en la formación de los hexámeros no se observa la presencia de Cu^{+2} (ver Figura 7) [10]. Esto indica que el Cu^{+2} únicamente participa en las primeras etapas de la formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$.

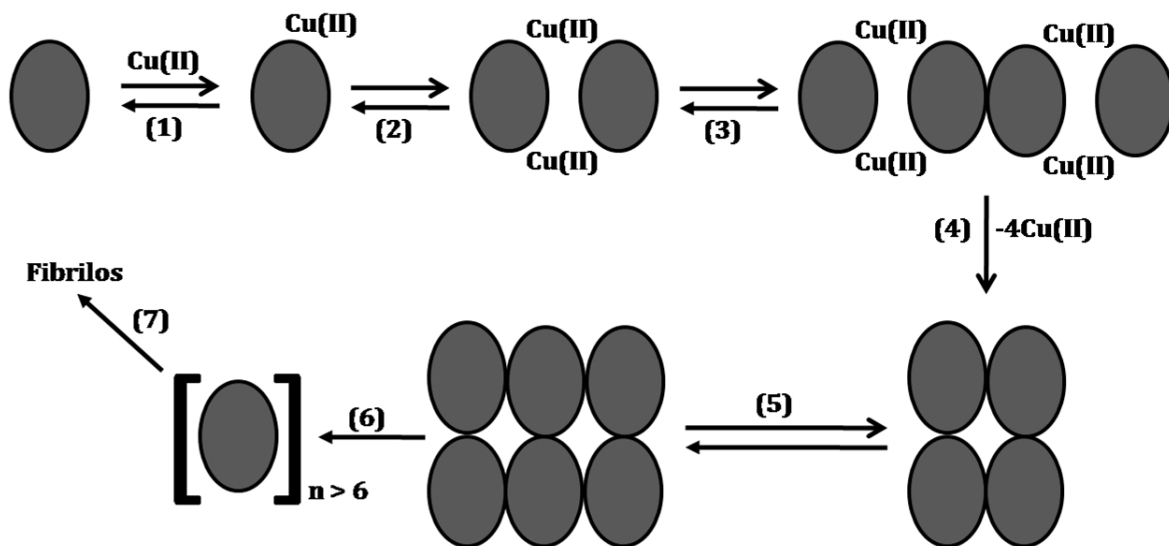


Figura 7. Modelo propuesto por Vachet *et al.* para explicar la formación de intermediarios oligoméricos $\beta 2m$ a pH neutro y en presencia de iones $Cu(II)$.

Otro aspecto relacionado con lo anteriormente expuesto es que la velocidad de formación de intermediarios oligoméricos no depende de la concentración de Cu^{+2} [9]. Datos de fluorescencia de ThT demuestran que la fibrillogénesis de $\beta 2m$ es un proceso dependiente de nucleación. En otras palabras, la formación de los intermediarios oligomeros anteriormente mencionados son necesarios para la formación de las fibras

amiloides $\beta 2m$. Sin embargo, la caracterización estructural de estas especies intermedias es una tarea actualmente difícil. Por tal motivo, Miranker *et al.* llevaron a cabo una serie de mutaciones en la proteína $\beta 2m$ nativa para lograr obtener información estructural de estos intermediarios oligoméricos. El primer caso fue la sustitución del aa Pro32 por Ala (denominado P32A) [30]. Datos previamente reportados por Goto *et al.* establecen que la Pro32, residuo que se encuentra ubicado entre las hebras B y C, es el responsable de la acumulación de los intermediarios oligoméricos que preceden a la formación de las fibras $\beta 2m$ debido a que este aminoácido sufre una transición *cis-trans*, la cual favorece la asociación proteína-proteína [81].

Con base en estos antecedentes, Miranker y colaboradores sintetizaron la P32A logrando aislar y caracterizar estructuralmente un intermediario oligomérico caracterizado por la asociación entre dos monómeros de P32A [30]. Lo interesante de sus resultados radica en que la formación de estos dímeros ocurre sin la participación de iones de cobre. Esto demuestra que el cobre logra actuar como un agente facilitador para alcanzar estados conformacionales en la $\beta 2m$ nativa a través de la interacción con la His31, el cual es necesario para obtener dímeros, tetrámeros y hexámeros.

La estructura tridimensional de la P32A fue resuelta mediante DRX. El monómero P32A es formado por los residuos de aa 4-97 de la proteína $\beta 2m$ nativa, donde el residuo Pro32 es reemplazado por alanina (Ala), creando una conformación *trans* con His31 [30]. La sustitución de la Pro32 promueve desplazamientos en el espacio de los residuos Phe30 y Phe62. Adicionalmente reportan un reordenamiento de la hebra D, debido rotaciones en el backbone de los aa 52-56, mediado por la Asp53. Esto tiene como consecuencia el aumento en la planaridad de la hebra D (ver Figura 8a).

De acuerdo con Miranker *et al.*, los cambios conformacionales en la Pro32 genera perturbaciones en diferentes aa. Ejemplo de ello es el aumento en la planaridad de la hebra D, la cual facilita interacciones entre proteínas de P32A hasta alcanzar los diferentes oligómeros. Consistente con otros resultados, la formación de dímeros de P32A se ori-

gina gracias a la asociación entre las hebras ABED-ABED y de manera antiparalela, mediada por la participación de la zona hidrofóbica en cada proteína (ver Figura 9).

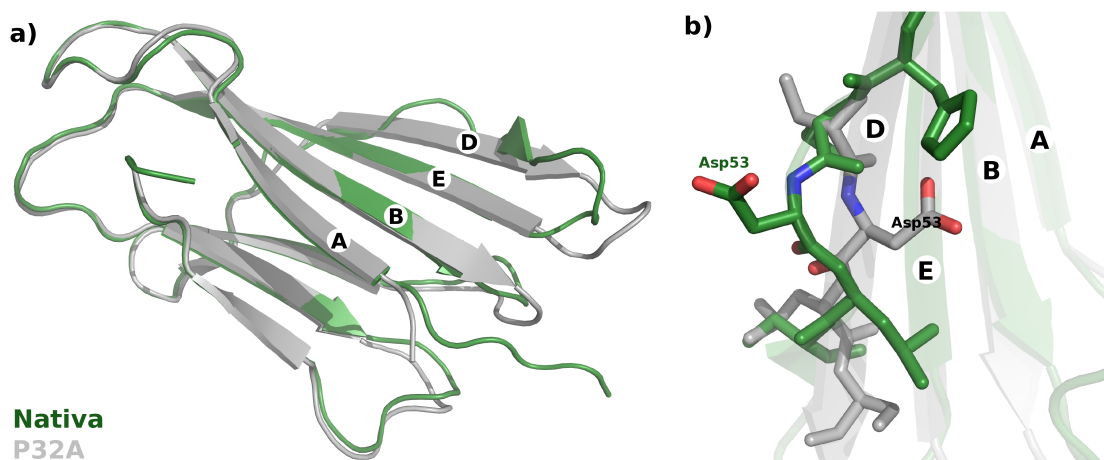


Figura 8. Reordenamiento estructural de la P32A. a) Comparación estructural entre la P32A (PDB 2F80) y la β_2m nativa (PDB 2CLR). b) Aumento de la planaridad en la hebra D generado por desplazamiento de la Asp53.

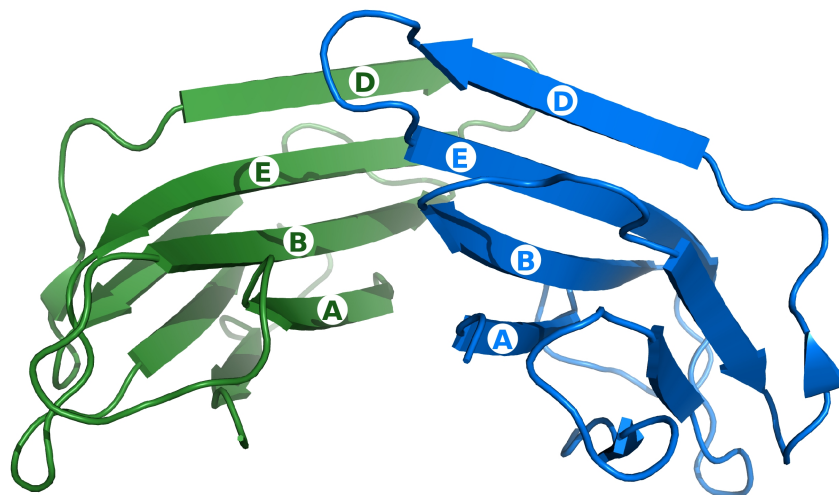


Figura 9. Estructura tridimensional del dímero formado por dos monómeros P32A, mostrando un ordenamiento antiparalelo y las interacciones entre las hebras ABED-ABED.

El segundo caso se basa en la mutación del aa His13 por Phe (esta mutación de la β_2m es denominada H13F) [31]. En contraste con la mutación P32A descrita anteriormente, Miranker *et al.* lograron obtener y caracterizar estructuralmente un intermediario oligomérico formado por seis unidades H13F. Adicionalmente encuentran la presencia de cobre coordinando con la His31 de cada monómero.

La estructura molecular del hexámero, formada por monómeros H13F, fue resuelta mediante DRX [31]. Cada uno de los monómeros contienen 98 residuos de aa de la $\beta 2m$ nativa (residuos 0-97), siendo el aa His13 reemplazado por Phe. En comparación con la $\beta 2m$ nativa, los monómeros H13F presentan una estructura similar con una desviación estándar de 1.5 Å en los carbonos α . Cada cadena de los monómeros H13F en el hexámero entran en contacto a través de dos interfases. La primera interfase es mediada por la interacción de la hebra D de cada monómero a través de puentes de hidrógeno entre átomos del backbone de los aa Leu54 e interacciones laterales entre Asp34 y His31. Otros contactos son de tipo hidrofóbico, los cuales involucran los aa His51 y Asp34. La planaridad de la cadena D en todos los monómeros H13F son similares a los encontrados en la $\beta 2m$ nativa (ver Figura 10b), indicando que esta hebra actúa como un agente inhibidor durante la asociación H13F-H13F y posteriormente en la formación de tetrámeros y hexámeros [31].

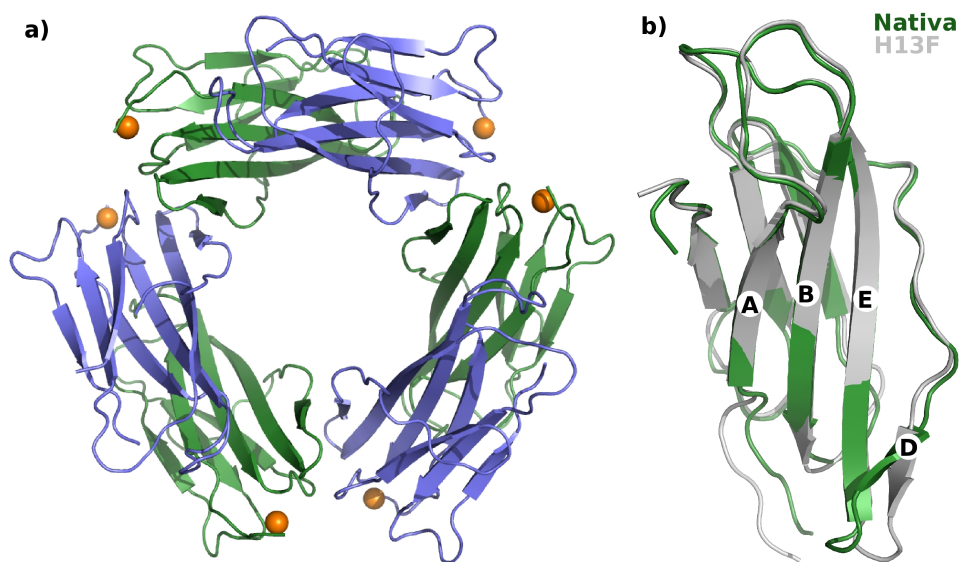


Figura 10. a) Estructura tridimensional del hexámero formado por monómeros H13F. b) comparación estructural de los monómeros P32A con la proteína $\beta 2m$ nativa.

La segunda interfase es mediada por la interacción antiparalela de las hebras ABED-ABED entre monómeros H13F vecinales (ver Figura 11a), debido a los contactos de tipo polar y aromático entre los aa 63:26:10:10:26:63 (ver Figura 11b). Adicionalmente, siete residuos de aa mostraron una desviación estándar >2 Å, comparada con la $\beta 2m$ nativa,

que incluyen los aa Ile1, Arg3, Phe30, debido a la presencia del cobre (ver Figura 11c). Como consecuencia de lo anterior, la hebra D en cada monómero H13F se desplaza 4 Å de la posición original en la $\beta 2m$ nativa [31].

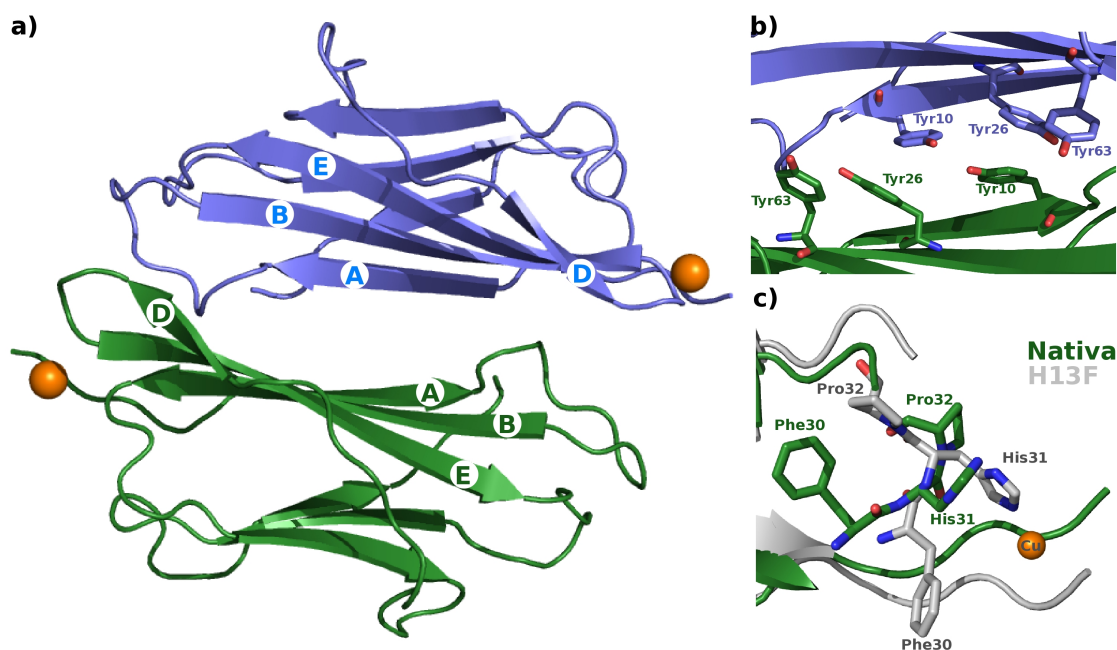


Figura 11. a) Representación tridimensional del ordenamiento antiparalelo de dos monómeros H13F a través de los contactos ABED-ABED. b) Residuos de aa implicados en la interfaz ABED-ABED. c) Perturbación de las posiciones de los aa Ile1, Arg3 y Phe30 debido al cobre.

Con base en estos resultados, Miranker *et al.* sugieren que los desplazamientos en el espacio de los aa anteriormente mencionados son prerequisites de vital importancia en la formación de intermediarios oligoméricos y tiene como consecuencia: Primero, el anillo de benceno en la Phe30 sufre un movimiento de hasta 8 Å, aumentando su área de contacto con el solvente. Segundo, la cadena lateral de la Pro32 adopta una conformación *trans* [31]. El reordenamiento de los aa Phe30 y Pro32 pueden ser espacialmente conectados con un conjunto de efectos distales (ya mencionados). Estos resultados son similares a los encontrados en la P32A, anteriormente descritos por los mismos autores [30], donde sugieren nuevamente la importancia de la presencia de iones de cobre en las etapas previas a la formación de fibras amiloides $\beta 2m$ [30, 31].

Vachet *et al.* analizaron la dinámica de formación de dímeros de $\beta 2m$ (en estado na-

tivo), mediante espectrometría de masas en combinación con estudios computacionales [32]. Al igual que Miranker *et al.*, observan la formación de una interfaz ABED-ABED antiparalela entre monómeros $\beta 2m$ en su estado nativo. Sin embargo, Vachet y colaboradores sugieren que las interacciones entre las hebras D-D es improbable durante formación del dímero. Esta idea es confirmada mediante experimentos de marcaje covalente, empleando ASNH (Acetato de sulfo-N-hidroxisuccinimida) y DEPC (Dietil pirocarbonato) para determinar la reactividad de los residuos His51, Lys58 y Ser57. Si la formación del dímero ocurre a través de interacciones D-D, se esperaría una disminución en la reactividad de estos residuos. Vachet *et al.* encuentran lo contrario a Miranker *et al.* sugiriendo que dichas interacciones no están presentes en la $\beta 2m$ nativa. En lugar de esto, plantean que la asociación proteína-proteína ocurre debido a la participación de las hebras A, B E y D.

Es notable el enorme avance que se ha logrado en cuanto al entendimiento de la amiloidosis asociada a diálisis, tales como la elucidación estructural de la proteína $\beta 2m$, la presencia de metales (en este caso el cobre) como agente facilitador durante la formación de oligómeros intermedios (dímeros, tetrámeros, hexámeros, etc) y la identificación de las variadas morfologías reportadas a condiciones específicas de pH y fuerza iónica. Sin embargo, aún no se ha descrito completamente las bases moleculares involucradas en la formación de estos depósitos.

Por tal razón, algunos autores han empleado herramientas computacionales para obtener mayor información de cada uno de las etapas anteriormente mencionadas. Debido a la complejidad estructural de estos sistemas moleculares, la mayoría de los trabajos han sido desarrollados empleando campos de fuerza, debido a su bajo costo computacional. A continuación se presentan brevemente algunos resultados teóricos de la fibrilogénesis $\beta 2m$, los cuales incluyen el efecto del pH, cambios conformacionales y formación de oligómeros intermedios.

2.1.3.3 Estudios teóricos relacionados con la estructura y formación de fibras amiloides de $\beta 2m$

Benyamini y colaboradores realizaron superposiciones sobre 51 diferentes estructuras de la $\beta 2m$, para obtener información acerca de las regiones dentro de la $\beta 2m$ que se conservaban [82]. Un total de 16 residuos fueron secuencialmente conservados y están localizados en las hebras B, C, E y F. Adicionalmente, 10 residuos de aa no coincidieron estructuralmente; de los cuales, 4 se encuentran ubicados en los extremos *N* y *C*-terminal y 6 en la hoja D con respecto a la estructura cristalina (PDB 1duz). Con base en lo anterior, Benyamini sugiere que la inestabilidad estructural de la hebra D está involucrada en la formación de fibras amiloides $\beta 2m$.

Basados en esta hipótesis, realizaron simulaciones de docking para establecer los sitios de contactos entre dos monómeros $\beta 2m$ [83]. Los resultados por docking establecen que la asociación $\beta 2m$ - $\beta 2m$ ocurre satisfactoriamente a través de interacciones entre la hebra D de un monómero; y la hebra B del segundo monómero, formando un cluster aromático entre residuos de aa como la Phe, His y Trp. Por último, proponen un modelo de formación de fibras amiloides $\beta 2m$ basado en un apilamiento de proteínas; cada una de ellas entra en contacto con la otra a través de la interacción entre hebras B y D; los cuales, según ellos, coincide con el modelo cross- β obtenido por DRX.

Por otro lado, Deng *et al.* emplearon dinámica molecular a escala de nanosegundos para determinar los cambios estructurales de la $\beta 2m$ nativa en función de la incorporación de iones de cobre [84]. Mediante calentamiento progresivo del sistema hasta 360 K, obtuvieron detalles a nivel molecular del proceso de desestabilización estructural en la $\beta 2m$. El análisis de las trayectorias obtenidas en todos los casos mostraron que durante la incorporación del cobre generaba mayores perturbaciones en la hebra D y parte de las hebras B, C y E como resultado de una mayor exposición hacia la superficie del solvente. Estos cambios en el ambiente hidrofóbico de la $\beta 2m$ obedecen a la manera en como el cobre se coordina con los distintos residuos de aa. Finalmente, Deng *et al.*

muestran que la coordinación del cobre con el residuo His13 no genera cambios apreciables en la estabilidad conformacional de la proteína; mientras que la coordinación con His31 es responsable directo de las perturbaciones en la estructura secundaria de la proteína $\beta 2m$ [84].

Para analizar el efecto causado por el pH en la estabilidad estructural de la $\beta 2m$, Armen y Daggett realizaron simulaciones de dinámica molecular [85]. Sus resultados indican la formación de dos estados intermedios con estructuras secundarias α -hélice y luego de la agrupación de cada unidad de proteína se obtiene nuevamente conformaciones de β -hélices. Esto sugiere un proceso complejo de desnaturalización.

Dokholyan y colaboradores realizaron simulaciones de dinámica molecular y docking para obtener intermediarios oligoméricos asociados a la fibrillogénesis [85]. Sus observaciones indican que la agrupación de unidades de $\beta 2m$ puede ocurrir principalmente por la participación del puente disulfuro entre los residuos Cys25 y Cys80 mediante reacciones de oxido-reducción generando dos rutas de asociación. En el estado oxidado, cambios conformacionales de la estructura secundaria y terciaria permiten obtener amiloides filamentosos; mientras que en el estado reducido se obtienen fibrilos con retención de la estructura nativa de la $\beta 2m$.

Recientemente, Vachet *et al.* realizaron simulaciones empleando docking para determinar las bases moleculares implicadas durante la formación de oligómeros intermedios [32]. Aunque observan una interfaz formada por el acoplamiento paralelo entre las hebras ABED de cada monómero; estos resultados están en acuerdo con los reportados previamente por Vachet *et al.*, el cual establecen un ordenamiento antiparalelo ABED-ABED.

2.2 CONCLUSIONES DEL ESTADO DEL ARTE

Es evidente el enorme esfuerzo que numerosos investigadores han realizado para entender de una mejor manera los procesos, a nivel molecular, de la formación de fibras amiloides $\beta 2m$. El uso de un amplio grupo de técnicas analíticas han facilitado realizar una exploración de las bases moleculares de la formación de dichos depósitos de los cuales se destaca: a) la aparición de un núcleo hidrofóbico; b) las distintas morfologías encontradas a condiciones específicas de síntesis; y c) la presencia de cofactores tales como el cobre que promueve perturbaciones en la estructura de la $\beta 2m$, las cuales son necesarias para la formación de fibras amiloides $\beta 2m$. Sin embargo, hasta el momento no se ha resuelto completamente la estructura de una fibra amiloide y se requiere mayor información sobre los cambios estructurales que se presentan durante la formación de oligómeros intermedios y por ende, no se cuenta con un modelo que describa el mecanismo detallado acerca la formación de fibras amiloides $\beta 2m$. Por tal razón, en este estudio se ha recurrido a herramientas computacionales con el fin de encontrar más información sobre este fenómeno.

Aunque en la actualidad se cuenta con numerosos modelos teóricos y computacionales, su uso requiere un alto costo computacional para poder brindar una exploración detallada sobre la dinámica de formación de fibras amiloides $\beta 2m$. Esto se debe principalmente al enorme tamaño que necesario para modelar la fibrillogénesis de la $\beta 2m$. En virtud de estas limitaciones, se propuso en este trabajo de investigación desarrollar un modelo teórico que permitiera de brindar información relacionada con la formación de estos depósitos. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparados con los reportados en la literatura, los cuales fueron descritos anteriormente.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un modelo simplificado de la asociación de la $\beta 2$ -Microglobulina, empleando herramientas computacionales basadas en el modelo de Ising, para describir la formación de fibras amiloides $\beta 2$ -Microglobulina en su estado nativo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Obtener los descriptores moleculares que describan las interacciones entre pares de monómeros de $\beta 2$ -Microglobulina.
- b. Implementar un algoritmo computacional basado en el modelo de Ising e incorporar los descriptores moleculares previamente calculados.
- c. Obtener las funciones de partición para analizar el estado termodinámico asociado a la formación de fibras amiloides $\beta 2m$.
- d. Calcular la velocidad de nucleación de las proteínas $\beta 2m$ bajo condiciones fisiológicas.

4. METODOLOGÍA

La formación de depósitos amiloides $\beta 2m$ fue estudiada considerándola como un proceso de nucleación, en el cual, las unidades de proteínas fueron sometidas a una serie de interacciones hasta observar la formación de la fase amiloide [86]. En este sentido, varios aspectos fueron tenidos en cuenta en este trabajo de investigación: i) La evaluación de la energía del sistema y ii) el esquema de muestreo para obtener información acerca de la dinámica de asociación mediante interacciones proteína-proteína y posteriormente la obtención de la fase amiloide.

4.1 OBTENCIÓN DE LAS ENERGÍAS DE CONTACTO

$\beta 2M$ - $\beta 2M$

En la actualidad existen dos técnicas de simulación ampliamente usadas. La primera conocida como dinámica molecular mediante la cual se puede analizar el movimiento de las partículas en función del tiempo. Esto se logra empleando las ecuaciones de la mecánica clásica desarrolladas por Newton. Es decir, la posición de cada partícula puede conocerse en cualquier instante de tiempo. La segunda técnica se denomina dinámica Monte Carlo y se caracteriza por permitir realizar una exploración de manera aleatoria, no determinística, de todas las posibles configuraciones que se pueden alcanzar en un sistema molecular. Ambas técnicas son de gran utilidad ya que se puede comprender los procesos dinámicos que ocurren a nivel molecular [87].

Para llevar a cabo simulaciones de la dinámica de formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$, es necesario calcular la energía para cada configuración, a escala atómica. Para

sistemas atómicos muy grandes, *i.e.* proteínas, solventes, etc, es imposible emplear modelos teóricos basados en la solución de la ecuación de Schrödinger. Para resolver este problema, numerosos campos de fuerzas han sido desarrollados por diversos autores; los cuales permiten analizar con gran precisión fenómenos de difusión, cambios conformacionales, adsorción, absorción, entre otros [87].

En el caso particular del estudio de las proteínas, los campos de fuerza mayoritariamente empleados son el AMBER [88] Y CHARMM [89], los cuales han sido construidos a partir de datos teóricos y experimentales. Infortunadamente, estos campos de fuerza no son suficiente para simular la formación de fibras amiloides. La limitación persiste igualmente al enorme costo computacional que implica analizar este fenómeno. Otra alternativa propuesta por diversos autores es el uso de campos de fuerzas denominados grano grueso; los cuales se caracterizan por reducir el número de grados de libertad del sistema molecular mediante funciones de energía potencial promedios [90–93]. Aunque estos últimos reducen significativamente el costo computacional, la mayoría de ellos no se encuentran disponibles o no son suficientes para explorar la dinámica de la fibrilogénesis de la $\beta 2m$.

Por tal motivo, fue necesario la construcción de un modelo mucho más simplificado para evaluar la energía de interacción del sistema proteína-proteína. Esto se logró reduciendo las zonas de contactos de cada $\beta 2m$; partiendo del hecho que durante el proceso de asociación de proteínas $\beta 2m$ no se presentan cambios conformacionales drásticos y se pueden considerar como partículas rígidas.

Como se mencionó en el estado del arte, la proteína $\beta 2m$ es compuesta por 99 residuos de aa; los cuales forman siete hebras; cuatro de ellas (ABED) forman la hoja I y las tres restantes (CFG) forman la segunda hoja y son estabilizadas mediante un puente disulfuro entre Cys25 y Cys80. Con base en las características estructurales de la $\beta 2m$, cinco puntos fueron seleccionados para representar las distintas regiones dentro de la $\beta 2m$ y construir todos los posibles sitios de contacto. La asignación de los puntos se

realizó de la siguiente manera: (1) Representación del centro de masa de la proteína; (2) representación de los loops que conectan las hebras A-B y E-F; (3) representación de la hoja II; (4) representación del aa Ile1; (5) representación de la hoja I (ver Figura 12).

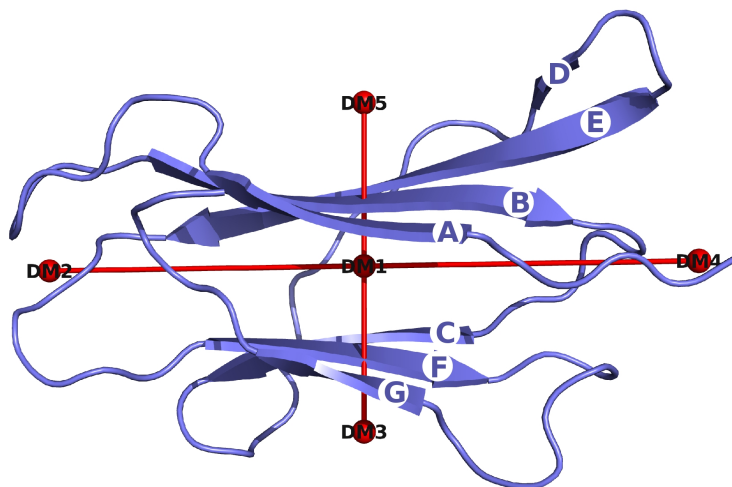


Figura 12. Representación tridimensional de los cinco puntos de contactos ubicados en las distintas regiones dentro de la $\beta 2m$.

Adicionalmente se consideraron dos tipos de proteínas, la primera correspondiente a la estructura libre de la $\beta 2m$ (la cual se denominó $\beta 2m_L$) y cuya estructura de partida fue extraída del CMH-I (código PDB 1duz); y la segunda proteína correspondió al complejo $\beta 2m-Cu^{+2}$ (la cual se nombró $\beta 2m_C$) en donde el cobre fue coordinado con los residuos His31, Ile1, Asp59 Gln2; según lo reportado por Vachet *et al.* [80].

La optimización de las geometrías de ambas proteínas fue realizada usando el método de paso descendiente. En este caso, cada estructura fue confinada en una caja tridimensional, cuyas dimensiones fueron de 7 nm de longitud y se insertaron moléculas de aguas para considerar efectos de solvatación. La evaluación de la energía de cada proteína fue modelada empleando el campo de fuerza AMBER03 [88]; mientras que las moléculas de agua fueron modeladas usando el modelo de solvatación explícito TIP3P [94]. El software empleado para esta etapa fue *Gromacs 4.0* [95, 96].

Partiendo de las geometrías optimizadas de cada proteína se llevó a cabo la evaluación

de la energía de interacción entre pares de monómeros de $\beta 2m$. Debido a que fueron empleados dos tipos de proteínas, tres clases de interacción fueron construidas: La primera correspondiente a la interacción de tipo $\beta 2m_L-\beta 2m_L$, la segunda de tipo $\beta 2m_C-\beta 2m_C$ y la tercera de tipo $\beta 2m_L-\beta 2m_C$.

A partir de cada una de las interacciones mencionadas anteriormente, se diseñaron todos los posibles contactos entre pares de proteínas teniendo en cuenta los cinco puntos ubicados en las diferentes regiones de cada tipo de proteína (ver Figura 13). En total se obtuvieron 162 contactos, los cuales fueron construidos usando la aplicación *g_edit*, que hace parte de la familia de sub-programas de *Gromacs 4.0* [95, 96].

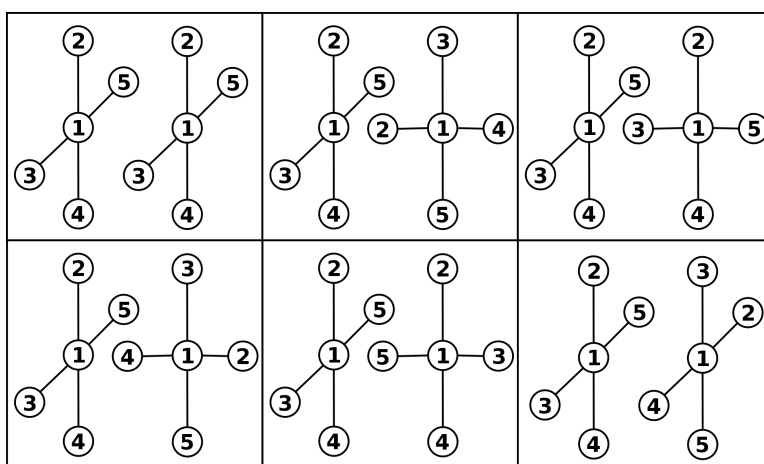


Figura 13. Modelos simplificados de los distintos contactos generados entre dos proteínas $\beta 2m$.

Para cada uno de los contactos anteriormente descritos se obtuvo el perfil de energía de interacción construyendo diferentes configuraciones en función de la distancia entre los puntos de contacto seleccionados de cada proteína y realizando un proceso de optimización de la geometría, manteniendo rígidos todos los átomos del backbone de cada proteína y usando igualmente el método de paso descendiente (ver Figura 15).

Cada una de las configuraciones fueron insertadas de igual manera en una caja tridimensional cuyas dimensiones fueron de 15.0 x 5.5 x 5.5 nm y luego fueron solvatadas con moléculas de agua. La energía de cada proteína fue evaluada empleando el campo

de fuerza AMBER03 [88] y las moléculas de agua fueron simuladas mediante el método de solvatación explícito TIP3P [94]. Adicionalmente se consideraron interacciones de Lennard-Jones y de Coulomb entre los pares de proteínas con un radio de corte de 5 nm.

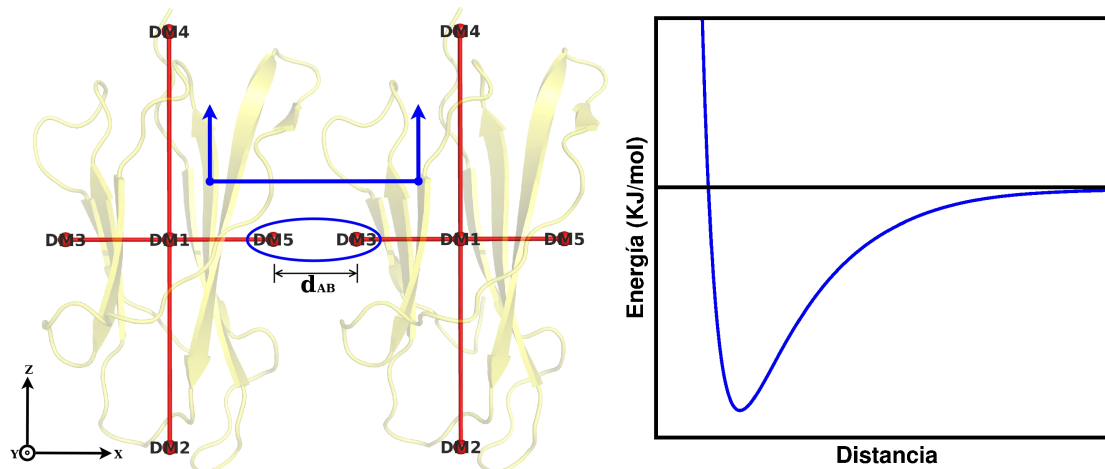


Figura 14. Construcción de los perfiles de energía de la interacción entre dos proteínas $\beta 2m$. *Imagen izquierda:* Contacto tipo 5:5. *Imagen derecha:* perfil de energía en función de la distancia entre los puntos 5:5.

Los valores de mínima energía de cada uno de los perfiles construidos para cada contacto fueron usados en la siguiente etapa de este trabajo de investigación, que se basó en el desarrollo de un algoritmo computacional para analizar la dinámica de formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$. Los detalles del algoritmo se muestran a continuación.

4.2 DINÁMICA DE LA ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA $\beta 2M$

Para el estudio de la asociación de proteínas $\beta 2m$ fueron considerados dos elementos de simulación importantes. La evaluación de la energía total y el esquema de muestreo. Para la evaluación de la energía total de los sistemas se empleó el modelo de Ising, el cual infiere una dependencia de la energía en las interacciones de cada proteína con sus alrededores. El esquema de muestreo se realizó usando el método de Metropolis. A continuación algunos aspectos generales de cada modelo.

4.2.1 Modelo de Ising

El modelo de Ising fue creado, en principio, para explicar el comportamiento ferromagnético de algunos materiales; es decir durante las transiciones de fases paramagnetismo \rightleftharpoons diamagnetismo [87]. La base fundamental del modelo radica en el concepto de una red (mono-, bi- o tridimensional) y en cada nodo de la red contiene partículas orientadas en el espacio configuracional (ver Figura 17). La característica más importante de este modelo es que cada partícula interactúa únicamente con sus vecinos y la energía total del sistema se calcula mediante la expresión:

$$E = - \sum_{ij} s_i s_j - h \sum_i s_i \quad (1)$$

Donde ij representa todos los pares vecinales, h es un parámetro que describe la interacción con un campo externo y s_i, s_j representan los espines de cada partícula tomando valores ± 1 . En este caso, el termino espín hace referencia a un estado particular de cada partícula que constituye el sistema. En la actualidad, el modelo de Ising es ampliamente usado para estudiar fenómenos como la nucleación [97], cambios conformacionales de proteínas [98] e inclusive ha sido usado para describir la formación de fibras amiloides de proteínas [99]. Para el último caso, la ecuación 1 es escrita de la siguiente manera:

$$E_{total} = \sum_{N=1}^{N_{total}} \epsilon(q_i, q_j) \quad (2)$$

Donde ϵ es la energía de interacción entre dos partículas vecinales ij , N_{total} es el número total de vecinos y q_i, q_j son los estados/orientaciones de cada partícula.

4.2.2 Método de Metropolis

El método de Metropolis permite obtener de manera aleatoria un conjunto de configuraciones, las cuales están asociadas a una función de distribución $Z(r^N)$ que es proporcional al factor de Boltzmann $e^{-U/k_B T}$ [87]. Este método considera dos estados a y b cuyas probabilidades son P_a y P_b respectivamente. la probabilidad con que ocurra una transición a \rightarrow b es W_{ab} ; mientras que la probabilidad con la que ocurre una tran-

sición $b \rightarrow a$ es W_{ba} . Entonces el factor de probabilidad para una transición desde un estado hacia otro es:

$$\frac{W_{ba}}{W_{ab}} = \exp\left(\frac{-\Delta E_{ab}}{k_B T}\right) \quad (3)$$

De acuerdo con la ecuación 3, la probabilidad con que ocurre una transición es controlada por el factor de Boltzmann que es aceptada cuando se presentan dos casos:

- Cuando $\Delta E_{ab} \leq 0$, la probabilidad W_{ab} que ocurre la transición es 1, entonces la nueva configuración se acepta.
- Si $\Delta E_{ab} > 0$, entonces $W_{ab} \propto \exp\left(\frac{-\Delta E_{ab}}{k_B T}\right)$. Luego comparamos a W_{ab} con un número obtenido aleatoriamente ζ entre $[0,1]$. Si $W_{ab} > \zeta$, se acepta la nueva configuración. Si $W_{ab} < \zeta$, se rechaza la configuración.

El algoritmo de Metropolis se emplea de la siguiente manera:

1. Calcular la energía total para la configuración a .
2. Obtener la configuración b de manera aleatoriamente.
3. Calcular la energía total para la configuración b .
4. Calcular el cambio de energía entre a y b y evaluar si se acepta la nueva configuración.
5. Realizar los procedimientos 1-4 hasta un número total de pasos de la simulación.

4.2.3 Desarrollo del algoritmo computacional

En esta sección se describe el algoritmo computacional desarrollado para estudiar la dinámica de asociación de proteínas $\beta 2m$. Cada una de las etapas de la simulación de este programa fueron distribuidas en diferentes subrutinas e implementadas en el lenguaje de programación Fortran 77. Aproximadamente se escribieron 2500 líneas de código y los detalles se presentan en el capítulo de Anexos, sección 1. Este código consta de 7 etapas principales:

- Iniciación
- Obtención de la configuración inicial (estado a)
- Cálculo de la energía del estado a : E_a
- Obtención de la nueva configuración (estado b)
- Cálculo de la energía del estado b : E_b
- Criterio de aceptación de la nueva configuración
- Cálculo de propiedades

El programa (que se ha llamado *Gising.exe*) se ejecuta de la siguiente manera:

```
[quintero@quintero-laptop ]$ ./Gising.exe input.inp output.out
```

Donde *input.inp* es el archivo de entrada y *output.out* es el archivo de salida. La ejecución de este comando es verificada por la subrutina **INITREAD()**, donde se confirma la existencia del archivo de entrada y se especifica el nombre del archivo de salida. Posteriormente, se lee el archivo *input.inp* que es analizado usando la subrutina **READPARS(TFILE)** para verificar el estado de todas las opciones requeridas para llevar a cabo cada simulación.

El archivo de entrada *input.inp* contiene todos los parámetros de la simulación. El archivo consta de 10 opciones. El primero (TITLE) denota el título de la simulación. El segundo (FILE_PAR) define el archivo de parámetros correspondiente a todos los valores de energía para cada contacto entre proteínas $\beta 2m$ vecinales. La tercera y cuarta fila corresponden a los archivos de salida, donde el primero imprime la trayectoria de cada simulación (FILE_TRAJ) usando coordenadas cartesianas y el segundo (FILE_ARRAY) imprime la matriz de la orientación de los cinco diferentes puntos para cada monómero. NSTEP es el número de pasos de la simulación; PRINT_STEP representa la frecuencia de impresión de los datos de energía, el archivo de las trayectorias y el archivo de la matriz de orientaciones. En la fila octava se especifica la opción

TEMP_REF y corresponde a la temperatura (en unidades Kelvin) de la simulación para calcular el factor de probabilidad de Boltzmann, empleando la ecuación 3. La opción DIM indica las dimensiones de la celda de tamaño DIM x DIM x DIM, donde son insertados los monómeros. Finalmente NPAR es la cantidad de monómeros los cuales son usados en cada simulación. En el capítulo ANEXOS se muestra un ejemplo del archivo de entrada.

Una vez que ha sido leído el archivo *input.inp*, el programa procesa los parámetros que han sido almacenados en el archivo *param.dat* como se presentan en las Tablas 1-3, usando la subrutina **READPARS(TFILE)**. La estructura de este archivo se organiza de la siguiente manera:

- La primera columna corresponde a los tipos de contacto entre dos proteínas $\beta 2m$; la letra F hace referencia a la proteína libre $\beta 2m_L$; mientras que la letra C hace referencia al complejo $\beta 2m_C$. Los números 1-5 corresponden a los cinco puntos que representan cada uno de las zonas de contactos anteriormente descritas.
- La siguiente columna corresponde a todas las diferentes orientaciones que puede tener cada uno de los distintos contactos encontrados.
- La columna de configuraciones hace referencia a la manera en como se diferencia una orientación de la otra para cada tipo de contacto. Para resolver esto, se recurre al cálculo de los ángulos formados entre dos vectores (ver ecuación 4), los cuales se construyen a partir de cuatro puntos, dos de ellos pertenecen al primer monómero mientras que los restantes puntos pertenecen al segundo monómero. En la Figura 15 muestra un ejemplo de los ángulos formados entres cuatro puntos de los dos monómeros. En las tablas de parametrización (ver Anexos, Tablas 1-3) se muestran dos valores de ángulos (ij y ji), se recurre al doble cálculo de estos ángulos debido a que algunas configuraciones presentan los mismos valores de los ángulos en la dirección ij .

$$\theta_{AB} = \cos^{-1} \left[\frac{\vec{A} \cdot \vec{B}}{|\vec{A}| |\vec{B}|} \right] \quad (4)$$

Donde θ es el ángulo formado entre dos $\beta 2m$ construyendo dos vectores de orientación, \vec{A} es el vector formado por dos puntos del primer monómero, \vec{B} es el vector formado por dos puntos del segundo monómero.

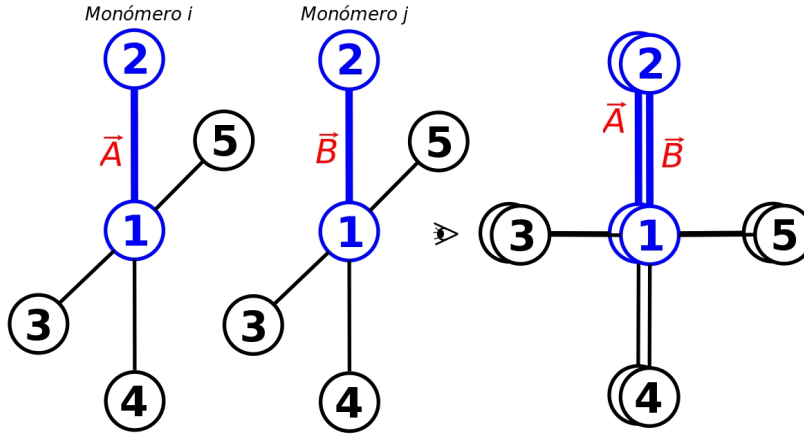


Figura 15. Construcción de vectores para determinar el tipo de orientación entre cada par de proteínas $\beta 2m$.

Luego de procesar y verificar el estado del archivo *param.dat*, se inicia la simulación que es invocada a través de la subrutina **MAIN()** y parte de la construcción de la configuración inicial (*a*) mediante la subrutina **INITIAL()**. Este proceso consta de dos pasos. El primero es la construcción de la red tridimensional; el cual contiene las posiciones cartesianas de todos los monómeros que serán incluidos en la simulación. El número de monómeros empleados es leído a través de la opción **NPAR** y son ubicados de manera aleatoria a lo largo de la red tridimensional.

El segundo proceso consta de la construcción de la matriz que contiene la ubicación de los cinco puntos que representan cada zona dentro de cada monómero $\beta 2m$. Para cada monómero, el centro de masa corresponde al punto C1/F1 y es ubicado en el origen $[0,0,0]$, los siguientes puntos C2/F2-C5/F5 se ubican de manera aleatoria y garantizando que no haya superposición entre cada uno de ellos. En la Figura 16 se muestra un ejemplo. Esta matriz es almacenada en el archivo *traj.arr*. La primera columna del esquema anterior hace referencia al tipo de proteína $\beta 2m$, CB2M significa $\beta 2m_C$ y FB2M significa $\beta 2m_L$. La segunda columna contiene información de cada uno de los cinco puntos

Archivo traj.arr					
CB2M	C1	1	0	0	0
CB2M	C2	1	0	0	1
CB2M	C3	1	0	1	0
CB2M	C4	1	0	0	-1
CB2M	C5	1	0	-1	0
FB2M	F1	2	0	0	0
FB2M	F2	2	1	0	0
FB2M	F3	2	0	-1	0
FB2M	F4	2	-1	0	0
FB2M	F5	2	0	1	0

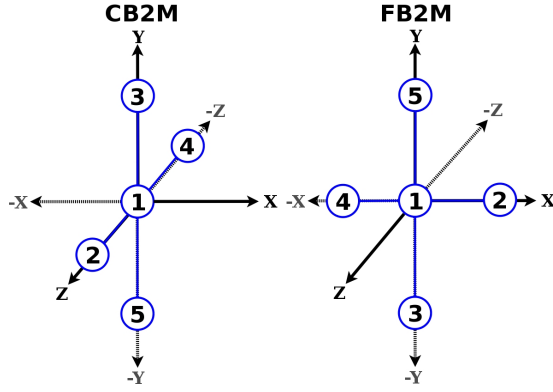


Figura 16. Ejemplo del archivo de matriz de datos para los cinco puntos de contacto. *Imagen izquierda:* Estructura del archivo *traj.arr*. *Imagen derecha:* representación espacial de los puntos de contacto en cada monómero.

para cada monómero $\beta 2m$. La tercera columna corresponde al i -ésimo monómero que hace parte de los NPAR en cada simulación. Las últimas tres columnas corresponden a los vectores unitarios, los cuales indican la orientación relativa de cada monómero en la red tridimensional. Primero se ubica el punto (1) en el centro. El punto (2) se ubica de manera aleatoria en cualquiera de los tres ejes de coordenadas x, y, z y al punto (3) se le realiza el mismo proceso garantizando que no se superponga con el punto (2). Los puntos (4) y (5) corresponden a las posiciones opuestas de (2) y (3) respectivamente.

Luego que se ha generado las posiciones de partida de cada monómero y la matriz de vectores de orientación, se determina cuáles monómeros son vecinales del estado a , empleado la subrutina **NEIGHBORS()**. Aquellos monómeros cuya distancia es igual a 1 se consideran vecinos y es calculada empleando la ecuación 5.

$$d_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad (5)$$

Todos los pares de monómeros vecinales son almacenados temporalmente en una matriz y posteriormente es empleada para calcular la energía total del sistema, que dependerá tanto del tipo de contacto como de la orientación relativa que conforma cada monómero en el par. Para el tipo de contacto se emplea igualmente la ecuación 5, pero en este paso se consideran los valores de los vectores de contactos almacenados en *traj.arr*. Luego se determina la orientación relativa de ambos monómeros vecinales empleando la ecuación

4. Cada uno de estos datos recolectados, se comparan con los parámetros almacenados en *param.dat* y finalmente se calcula la energía total del sistema, empleando la subrutina **ENERGY()**. Esta etapa corresponde a la energía total del estado a (E_a).

El siguiente paso del programa es obtener la configuración b . Para ello se selecciona de manera aleatoria un monómero en la red y se determina que tipo de cambio se va a realizar. Tres tipos de cambios se tienen en cuenta: 1) movimiento del monómero hacia una posición diferente (ver Figura 17), los cuales pueden ser dos tipos: únicamente el monómero que ha sido seleccionado o el monómero seleccionado junto con todos los vecinos; 2) cambios de la orientación de los cinco puntos en la misma posición a la cual se encuentra el monómero ó 3) cambiar el tipo de proteína CB2M→FB2M o FB2M→CB2M.

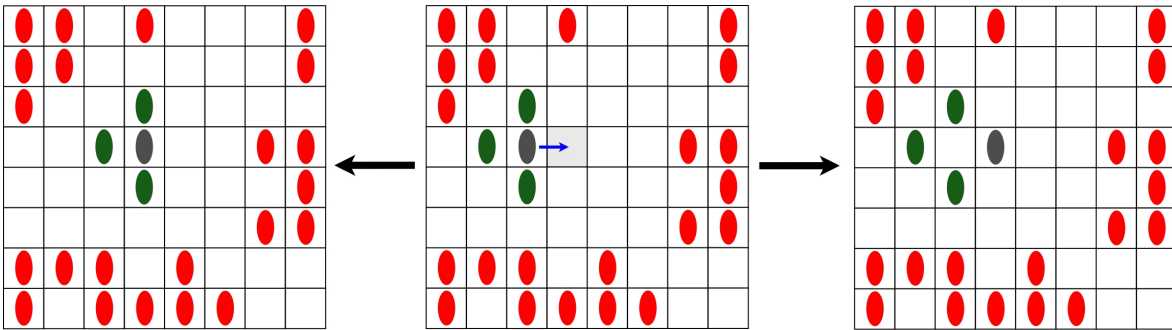


Figura 17. Ejemplo de los tipos de movimientos que se pueden generar en cada simulación.

Luego que se genera la configuración b , se calculan todos los contactos y posteriormente el valor total de la energía (E_b). La nueva configuración es aceptada si cumple con las condiciones expuestas en la sección *Método de Metropolis*. Este proceso se realiza de manera iterativa hasta que el valor del ciclo sea igual a NSTEP. En la Figura 18 se presenta un esquema del diagrama de flujo de todos los pasos anteriormente descritos.

En total son cuatro los archivos generados durante cada simulación con *Gising.exe* y la información se imprime cada PRINT_STEP. El archivo de trayectorias *traj.xyz*; el archivo de la matriz de vectores para cada monómero *traj.arr*; el archivo principal *output.out* y por último un archivo denominado *output.out.nsl* el cual contiene infor-

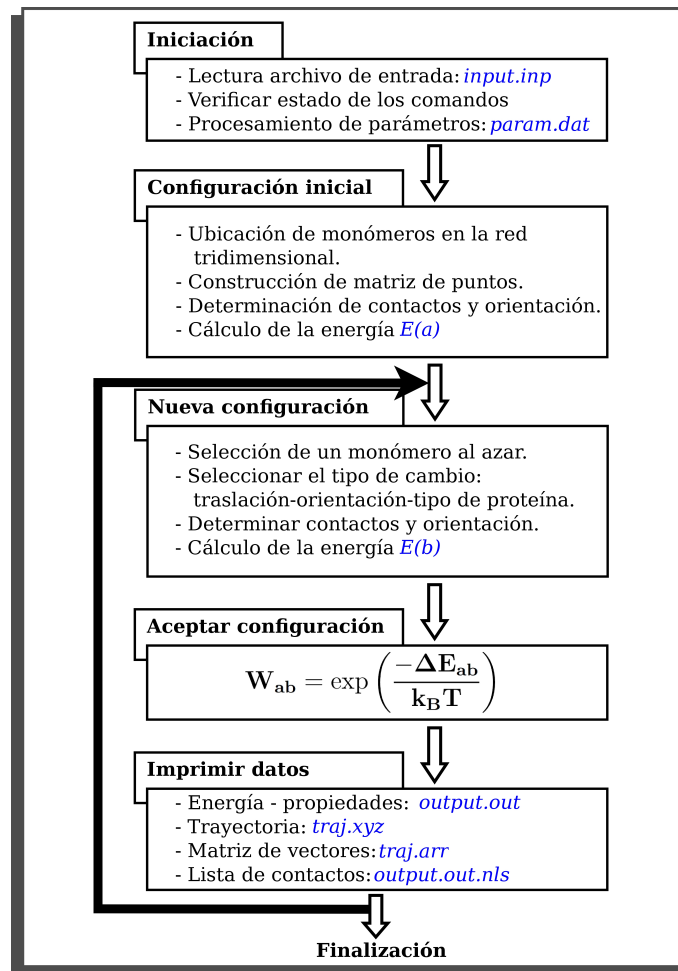


Figura 18. Diagrama de flujo del programa de simulación *Gising.exe*.

mación de cada par de monómeros vecinales los cuales son usados para determinar las características morfológicas de todos los puntos en la red tridimensional donde se han formado depósitos amiloides. A continuación se muestra un ejemplo del archivo de salida *output.out*.

```

=====
==
**                               VERSION 1.0                               **
**          AMYLOID SOFTWARE FOR B2-MICROGLOBULINE          **
*****
*****
*****
*****
**                               **
*****          STARTED AT:  Fri Jul  2 14:48:21 2010          *****
**                               **
=====
==
**                               Input File ==>  input.inp                               **

```

```

**                               Output File ==>  output.out          **
**                               Hostname ==>   node05.cluster.quimi  **
**                               Username ==>   **                    **
**                               Process ID ==>  30131                 **
**                               FOLDER PATH:   **                    **
** /home/giftex/jorge/test/ultima          **                    **
=====
==
==          >>>>>  READING SIMULATION INFORMATION  <<<<<<          ==
=====
==
**      PARAMETER FILE:      param.dat          **
**      TRAJECTORY FILE:    traj.xyz           **
**      ARRAY FILE:         traj.arr           **
**      STEPS:              5000000           **
**      RANDOM NUMBER:      1                  **
**      TEMPERATURE (K):    310.0             **
**      BOX DIMENSIONS:     50  50  50         **
**      AMOUNT OF PARTICLES: 400              **
-----
--
==          >>>>>  STATUS FOR READING: OK! <<<<<<          ==
=====
==
**
**          >>>>>  START SIMULATION  <<<<<<          **
**
-----
--
**      ITER      ENERGY      NEIGH      Nmin      Nmax      < N >      TCPU **
**      0         -63.5000      6        2        3        2.20      0.00 **
**      1000      -127.9481     9        2        4        2.29      8.00 **
**      2000      -211.2181    11       2        4        2.22      8.00 **
**      3000      -243.1857    14       2        4        2.17     11.00 **
**      4000      -264.4862    15       2        4        2.15     10.00 **
**
**      . . . . .
**
**      5000000    -17046.2841    513      2        26       8.19     67.00 **
*****
**
**      Normal Termination for Simulation          **
*****      ENDED ON:  Tue Jul  6 04:16:22 2010      *****
-----
--
**      Hours:      85          **
**      Minutes:    28         **
**      Seconds:    11.9       **
**-----

```

El archivo *output.out* consta de una parte informativa del programa tales como versión, información de autores, etc. Posteriormente, se imprime el estado de los ciclos de la simulación. La primera columna indica el ciclo de simulación (ITER); la segunda

columna pertenece a la energía total del sistema (kJ/mol); NEIGH es el número de vecinos calculados; Nmin es la formación de asociaciones con la menor cantidad de monómeros; Nmax es la asociación con la mayor cantidad de monómeros de $\beta 2m$ y $\langle N \rangle$ corresponde al tamaño promedio de las asociaciones encontrada en el ciclo de simulación que se calcula empleando la ecuación 6. Finalmente TCPU corresponde al tiempo computacional (dado en segundos) que es invertido en el *i-ésimo* paso de simulación.

$$\langle N \rangle = \frac{\sum_{n_i=1}^{n_t} m_i}{n_t} \quad (6)$$

Donde n_i es el *i-ésimo* punto donde se ha formado una asociación, n_t es el número total de puntos de asociación y m_i es la cantidad de monómeros que conforman el *i-ésimo* punto en la red donde se ha formado una asociación.

4.2.4 Simulaciones de la dinámica de asociación de monómeros de $\beta 2m$

Las simulaciones de la dinámica de asociación de proteínas $\beta 2m$ fueron llevadas a cabo empleando el programa *Gising.exe* descrito en la sección anterior. Todas las simulaciones se realizaron manteniendo constante el volumen de la caja y cuyas dimensiones fueron 50 x 50 x 50 (parámetro adimensional). Esto es equivalente a tener 125.000 puntos reticulares. Múltiples simulaciones se realizaron variando los parámetros de temperatura y cuyos valores fueron ($T=\{100, 310, 500$ y 700 K} y la cantidad de monómeros ($N=\{50, 100, 200, 400, 600$ y $800\}$). Para cada caso de simulación (T y N) se realizaron 10 réplicas partiendo de configuraciones iniciales distintas.

5. RESULTADOS

5.1 ENERGÍAS DE CONTACTO $\beta 2M$ - $\beta 2M$

Los perfiles de energía de interacción entre monómeros de $\beta 2m$ fueron obtenidos satisfactoriamente empleando el método de optimización de paso descendiente y evaluando la energía usando el campo de fuerza AMBER03. Cabe recordar que fueron consideradas tres tipos de interacciones: i) $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$, ii) $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$ y iii) $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$. Para cada una de las interacciones mencionadas se diseñaron diferentes modos de contactos (1:1, 2:2, 3:3, etc) de acuerdo con los cinco puntos descritos en la sección de la Metodología.

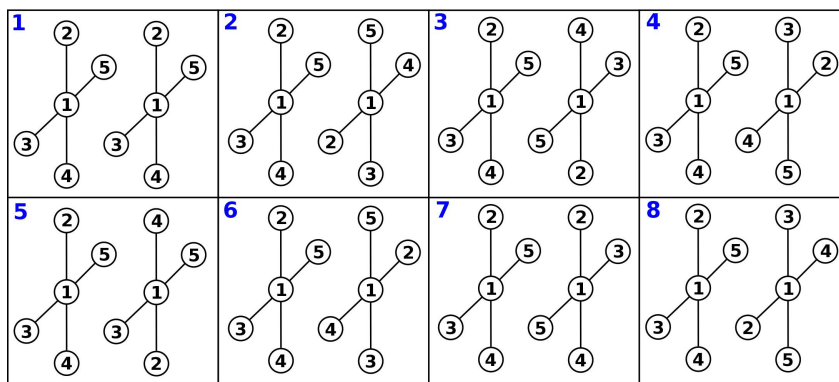


Figura 19. Representaciones simplificadas para los contactos de tipo 1:1.

A cada uno de los posibles contactos se construyeron diferentes configuraciones en función de la orientación relativa de cada monómero en el dímero (ordenamiento paralelo, antiparalelo y perpendicular). Estas orientaciones fueron diferenciadas calculando el ángulo formado entre las dos proteínas de $\beta 2m$ seleccionando dos puntos en cada una de ellas.

Los monómeros $\beta 2m_L$ y $\beta 2m_C$ no sufrieron cambios estructurales significativos luego de la optimización de la geometría en comparación con la estructura nativa de la $\beta 2m$ presente en el CMH-I. La desviación cuadrática media para la $\beta 2m_L$ fue de 0.007 nm mientras que con la $\beta 2m_C$ se obtuvo un valor de 0.111 nm. Esta última proteína presentó un valor mayor debido a la incorporación del ión cobre en los residuos de aa His31, Ile1, Asp59 Gln2 de la $\beta 2m$ (ver Figura 20).

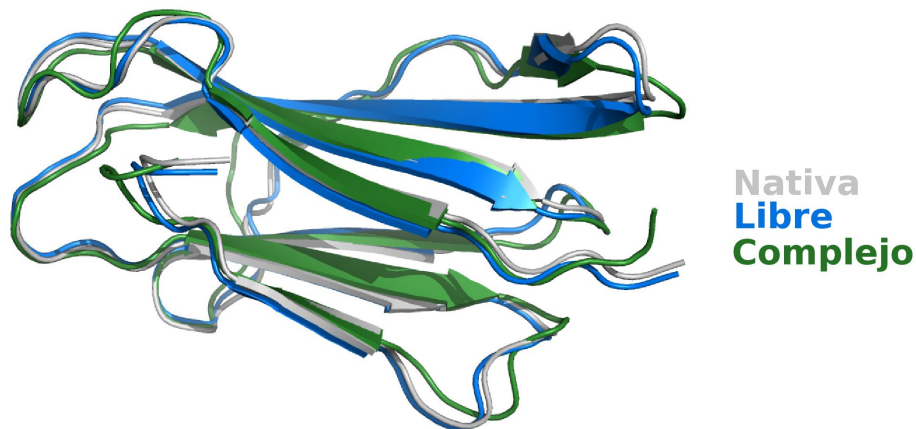


Figura 20. Comparación estructural de la $\beta 2m$ de tipo libre y complejo con la encontrada en el CMH-I.

5.1.1 Descripción de las interacciones: perfiles de energía de interacción entre dos monómeros de $\beta 2m$

Para la construcción de los perfiles de energía de interacción entre dos proteínas de $\beta 2m$, la distancia inicial entre los centros de masa para todas las orientaciones construidas fueron de 2.0 nm ya que por debajo de esta valor se presentaron superposiciones entre átomos de ambas proteínas $\beta 2m$ y generando valores de energía extremadamente elevados (por encima de 1×10^5 kJ/mol). A partir de 2 nm de distancia entre los centros de masa de los dos monómeros se observaron valores de energía del orden de 400 kJ/mol los cuales fueron tomados como valores iniciales para la construcción de los perfiles de energía. En general, la distancia intermolecular de menor energía varió entre 2.4 - 5.2 nm. Las distancias intermoleculares de equilibrio para las interacciones $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$, $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$ y $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$ se reportan en las Tablas 4, 5 y 6 respectivamente. Los

resultados de los perfiles de energía de la interacción entre dos monómeros para todas las orientaciones, de cada contacto, se presentan en las Figuras 45-47.

5.1.1.1 Contactos 1:1

Los contactos entre los centros de masa de cada proteína correspondieron a las interacciones 1:1, siendo F1:F1 para $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$, C1:C1 para $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$ y C1:F1 para $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$. Cada uno de ellos presentaron ocho posibles orientaciones según se muestran en la Figura 19 (denominadas 1-8).

En la orientación 1:1_1, ambos monómeros $\beta 2m$ se alinean paralelamente. A partir de esta orientación se construyeron las orientaciones 1:1_2, 1:1_3 y 1:1_4 mediante giros de 90° sobre el segundo monómero. Los contactos 1:1_6, 1:1_7 y 1:1_8 se obtuvieron a partir de 1:1_5. Este último se diferencia con 1:1_1 debido al ordenamiento antiparalelo entre ambos monómeros, debido a los puntos 2 y 4.

De todos los contactos de tipo 1:1 la orientación que presentó una menor energía de interacción fue la de tipo 1:1_5, cuyos valores fueron -18.560 kJ/mol para $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$, -23.430 kJ/mol para $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$ y -19.460 kJ/mol para $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$. Las distancias entre los centros de masa fueron 3.0 nm, 2.8 nm 3.0 nm. Estas orientaciones se caracterizaron por presentar un ordenamiento antiparalelo debido a los puntos 2 y 4 (ver Figura 21).

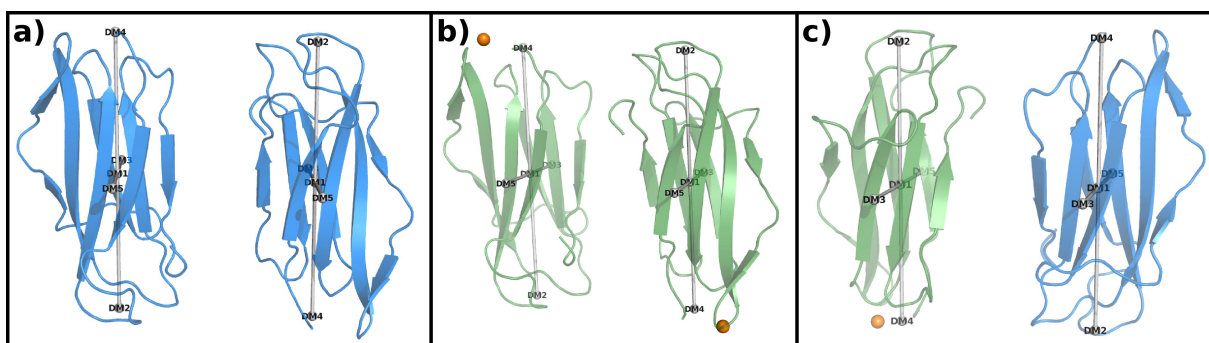


Figura 21. Representación tridimensional de las orientaciones 1:1_5 de menor energía. a) $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$; b) $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$; c) $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$.

5.1.1.2 Contactos 1:2

Los contactos 1:2 (ver Figura 22) se caracterizaron por el contacto entre el centro de masa del monómero 1 y el punto 2 del segundo monómero. En este caso se obtuvieron cuatro diferentes orientaciones. Las orientaciones 1:2_2, 1:2_3 y 1:2_4 fueron construidas a partir de 1:2_1 realizando giros de 90° sobre el segundo monómero y manteniendo fijo el primer monómero. Todas estas configuraciones se caracterizaron por presentar una orientación perpendicular y cuyas distancias entre los centros de masa fueron entre 3.8 y 4.0 nm. También se observó que las energías de interacción para todos los casos fueron cercanas, con excepción de las orientaciones 1:2_2 y 1:2_3 del tipo $\beta 2m_C-\beta 2m_C$, cuyos valores fueron -15.090 kJ/mol y -13.310 kJ/mol consecutivamente.

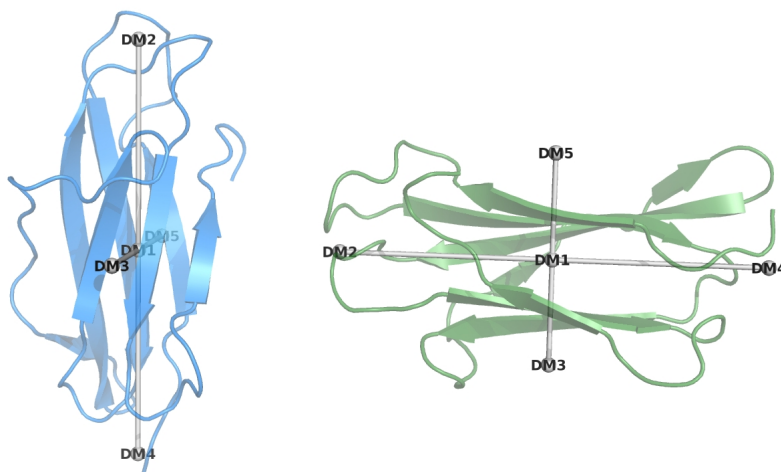


Figura 22. Representación tridimensional de la orientación 1:2-1.

El ordenamiento perpendicular también se observó en los contactos 1:4 (de tipo $\beta 2m_L-\beta 2m_L$, $\beta 2m_C-\beta 2m_C$, $\beta 2m_C-\beta 2m_L$). Siendo 1:4_3 (de tipo $\beta 2m_C-\beta 2m_C$) y 1:1_1 (de tipo $\beta 2m_C-\beta 2m_L$) los de menor energía de interacción.

5.1.1.3 Contactos 1:3 y 1:5

Para los contactos 1:3 y 1:5 se construyeron igualmente cuatro diferentes orientaciones empleando el mismo procedimiento descrito anteriormente. Las orientaciones 1:3_1 y 1:5_1 presentaron un ordenamiento paralelo; mientras que 1:3_3 y 1:5_5 fueron antiparalelas debido a los puntos 2 y 4. En los casos 1:3_2, 1:3_4, 1:5_2 y 1:5_4 fueron

perpendiculares. Para todas la configuraciones anteriores, 1:3_3 del tipo $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$ correspondió a la orientación de menor valor de energía y cuyo valor fue de -18.530 kJ/mol.

5.1.1.4 Otros contactos

Para todos los contactos que no involucraron la participación de los centros de masa de cada proteína $\beta 2m$ se construyeron tres diferentes orientaciones. Para los casos 2:2, 2:4 y 4:4, cada proteína en el dímero se alineó en la misma dirección del eje en el cual se llevó a cabo la construcción de los perfiles de energía de interacción (ver Figura 23). Los contactos 2:2 y 4:4 presentaron un ordenamiento antiparalelo, mientras que 2:4 fue paralelo. Para estas configuraciones la distancias de equilibrio variaron entre 4.4 - 5.2 nm. Los valores de energía de interacción para estos casos también fueron cercanos.

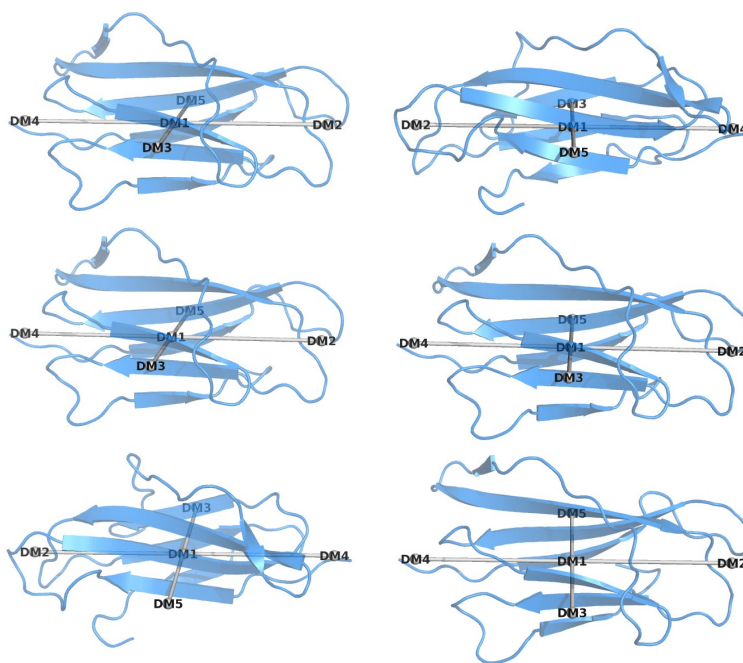


Figura 23. Representación tridimensional de las orientaciones 2:2_1, 2:4_1 y 4:4_1

Las interacciones a través de las hojas de cada una de las proteínas $\beta 2m$ correspondieron a los contactos 3:3, 3:5 y 5:5 de las cuales se obtuvieron orientaciones paralelas (3:3_1, 3:5_1 y 5:5_1), antiparalelas (3:3_3, 3:5_3 y 5:5_3) y perpendiculares (3:3_2, 3:5_2 y 5:5_2). Para cada uno de estos contactos las orientaciones antiparalelas presentaron

valores menores de energía.

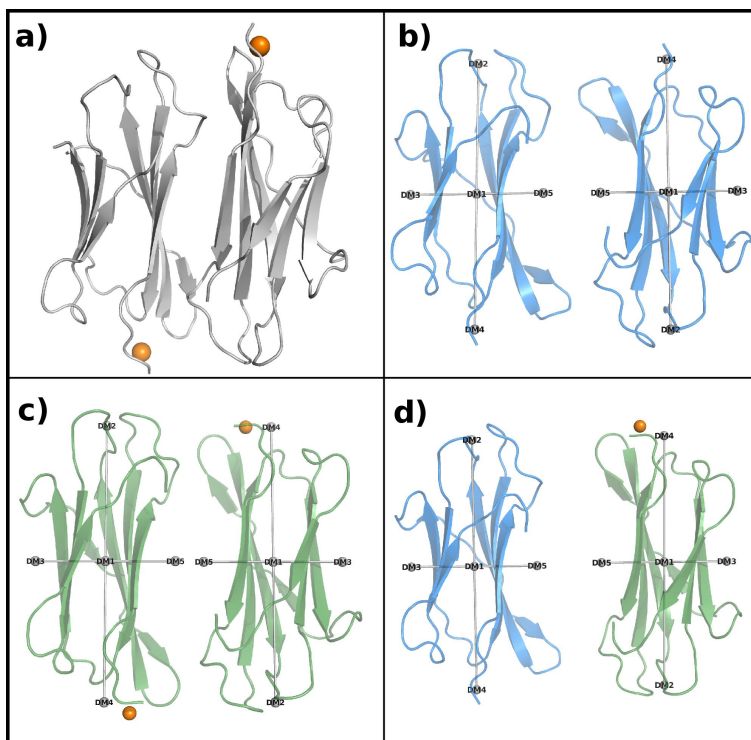


Figura 24. Representación tridimensional de las orientaciones 5:5.3 para los contactos. a) Estructura tridimensional de uno de los dímeros de $\beta 2m$ -H13F reportado por Miranker *et al.*, b) orientación 5:5.3 $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$, c) orientación 2:2.3 $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$, d) orientación 5:5.3 $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_C$

En la Figura 24 se muestran configuraciones de tipo 5:5 correspondientes al ordenamiento antiparalelo y la interacción entre las hojas II de cada proteína $\beta 2m$. Las orientaciones 5:5.3 de tipo $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$, $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$ y $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$ representaron los contactos a través de la hoja II de cada tipo de proteína $\beta 2m$. Cada una de ellas presentó un ordenamiento antiparalelo debido a la dirección de los puntos 2 y 4. Las distancias de menor energía fueron 2.8 nm, 2.4 nm y 2.8 nm respectivamente. Las energías de interacción obtenidas fueron -61.040 kJ/mol para $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$, -26.590 kJ/mol para $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$ y -43.840 kJ/mol para $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$. Es decir, la configuración de menor energía fue la formada por dos proteínas $\beta 2m$ sin presencia del cobre. Este tipo de orientación también fue observada en los distintos dímeros que conformaron el intermediario oligomérico usando la mutación H13F caracterizado por Miranker *et al.* en el que se observa la presencia de iones cobre en cada monómero. La distancia entre

los centros de masa de los dímeros presentes en este intermediario oligomérico fue de 2 nm, muy cercana a la encontrada en la orientación 5:5_3 $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$ de 2.4 nm. En la Figura 25 se presentan superpuestas la estructura encontrada por Miranker y la 5:5_3 en donde se evidencia una gran cercanía entre estas.

De acuerdo con las configuraciones 5:5_3 analizadas en este trabajo sugieren que la estabilidad de la formación de dímeros mediante interacciones entre las hojas II de cada proteína $\beta 2m$ sigue un orden $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L > \beta 2m_C$ - $\beta 2m_L > \beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$. En contraste con estos resultados, Vachet *et al.* establecen que durante la formación de intermediarios oligoméricos de $\beta 2m$ el cobre se encuentra presente tanto en dímeros como tetrameros, indicando que los dímeros de tipo complejo-complejo son mucho más estables energéticamente. Esta notoria diferencia obedece a la manera en como se construyeron los diferentes contactos entre los diferentes tipos de monómeros.



Figura 25. Comparación estructural entre los dímeros H13F (color gris) y 5:5_3 ($\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$, color verde).

Los perfiles de energía encontrados para la formación de dímero empleando dos tipos de $\beta 2m$ ($\beta 2m_L$ y $\beta 2m_C$) sugieren que existen configuraciones cuya energía de interacción son favorables durante el proceso de formación de intermediarios oligoméricos. Las orientaciones más estables fueron aquellas que involucraron la participación de las hojas I y II de cada proteína $\beta 2m$. En el caso particular de las interacciones entre las hojas II, el ordenamiento antiparalelo de cada proteína favoreció la formación de dímeros. Adicionalmente, los orientaciones 5:5_3 de tipo $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$ y $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$ presentaron

energía de interacción menores que en el dímero $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$ sugiriendo que pueden ser especies estables que no han sido detectadas experimentalmente.

5.2 FORMACIÓN DE DEPÓSITOS AMILOIDES $\beta 2M$

La siguiente fase del presente trabajo se basó en el estudio de la dinámica de formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$. Para ello se desarrolló un algoritmo computacional en el cual se consideraron dos esquemas de simulación. El primero referente al cálculo de la energía total del sistema, en el cual se implementó el método de Ising para considerar únicamente interacciones de cada tipo de proteína $\beta 2m$ con sus vecinos. Adicionalmente cada uno de estos monómeros fueron confinados en puntos discretos dentro de una red cúbica tridimensional; es decir, llevando a cabo simulaciones en un espacio discreto.

Como consecuencia de emplear un espacio discreto fue necesario utilizar el algoritmo de Metropolis para analizar la dinámica de asociación de unidades de proteínas de $\beta 2m$. En este sentido, se consideraron tres posibles caminos para obtener cada una de las nuevas configuraciones a lo largo de cada simulación: 1) movimiento de monómeros, 2) intercambio del tipo de proteína ($\beta 2m_L \rightarrow \beta 2m_C$ o $\beta 2m_C \rightarrow \beta 2m_L$) y 3) rotaciones de los vectores de orientación sobre un monómero seleccionado aleatoriamente.

Todas las simulaciones fueron llevadas a cabo empleando una red tridimensional cúbica y cuyas dimensiones fueron de 50 x 50 x 50 que es equivalente a tener 125 000 puntos reticulares en los cuales pueden ubicarse un monómero. Los parámetros que se variaron en estas simulaciones fueron la cantidad de monómeros (que es asociada con la concentración) y la temperatura ya que son asociados con la velocidad con la que se forman tanto los intermediarios oligoméricos como la fase amiloide. Para cada caso N, T se realizaron 10 réplicas independientes garantizando que la configuración inicial en cada caso fueran diferentes.

Como se ha discutido anteriormente, el uso de campos de fuerza que involucran todos

los átomos en un sistema molecular implica un elevado costo computacional. Caso contrario ocurre cuando se emplean modelos de grano grueso el cual simplifica el cálculo de la energía total en función de los grados de libertad seleccionados. En el caso particular de este trabajo, las interacciones a nivel atómico fueron omitidas y únicamente se hizo énfasis en las interacciones a través de cinco diferentes puntos rígidos los cuales fueron escogidos de acuerdo con las características morfológicas de la proteína $\beta 2m$. Esto implica que los posibles cambios conformacionales que se puedan presentar dentro de la estructura de cada proteína no han sido tenidos en cuenta. Con base en las consideraciones anteriormente mencionadas se logró estudiar el proceso de formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$ empleando grandes cantidades de monómeros revelando las bondades de estos modelos a un bajo costo computacional.

Cada una de las simulaciones iniciaron con la distribución aleatoria de monómeros de $\beta 2m$ a lo largo de las direcciones x, y, z de la caja tridimensional. A medida que avanzaron las simulaciones, cada monómero seleccionado pudo llevarse a través de tres caminos diferentes de muestreo: traslación, rotación de los puntos que contiene información estructural de cada proteína $\beta 2m$ e intercambio entre las distintas clases de proteínas $\beta 2m$ (complejo y libre).

Durante la traslación de unidades de proteínas, se observaron dos procesos importantes. El proceso de difusión, como consecuencia de la movilidad que adquiere cada unidad de proteína a lo largo de las dimensiones de la caja tridimensional y el proceso de adsorción debido a la interacción con otro monómero de $\beta 2m$ formando un nuevo par de monómeros vecinales. El proceso de adsorción fue dependiente de la energía de interacción de cada uno de los dímeros formados en cada simulación.

5.2.1 Distribución de energía y número de contactos

En la Figura 26 se presenta los resultados relacionados con el número de contactos y la energía total del sistema para las simulaciones donde se varió la cantidad de monómeros desde $N = 50$ hasta $N = 800$ y la temperatura se mantuvo constante a 310 K.

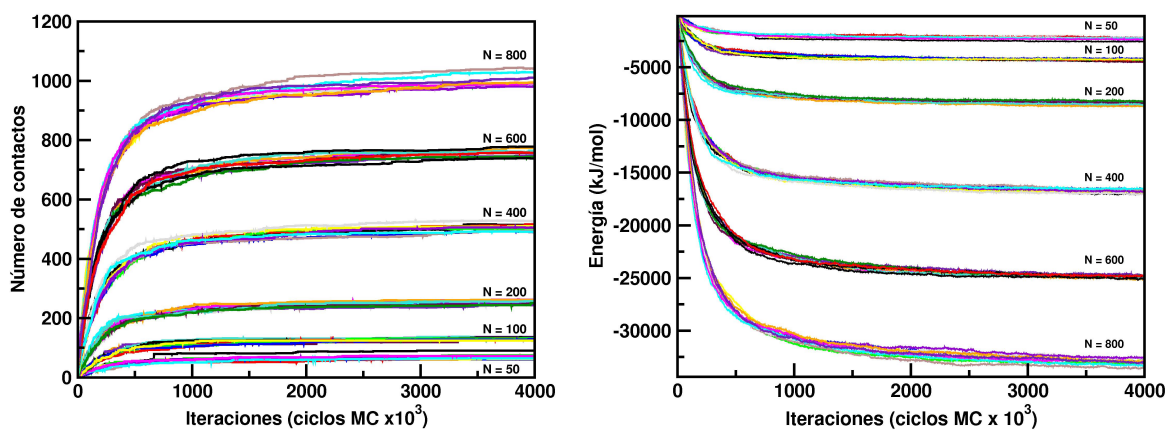


Figura 26. Energía total y número de contactos para las simulaciones de dinámica.

Como podemos observar en la imagen izquierda de esta figura, a medida que avanzó cada simulación el número de contactos entre proteínas de $\beta 2m$ aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo. Esto es debido a la capacidad que tuvo cada monómero para desplazarse dentro de la red cúbica hasta entrar en contacto con un monómero vecinal. Transcurridos 4×10^6 ciclos de simulación el número máximo de contactos aumentó para cada grupo de simulaciones. Para $N = 50$ el número de contactos máximo varió entre 61 y 90; $N = 100$ varió entre 124 y 136; $N = 200$ varió entre 243 y 262; $N = 400$ varió entre 491 y 596; $N = 600$ varió entre 727 y 778 y finalmente para $N = 800$ varió entre 980 y 1041.

En la Figura 26 (imagen derecha) se muestra la energía total del sistema para cada simulación variando la cantidad de monómeros y manteniendo fija la temperatura ($T = 310 K$). Como se puede observar, la energía total disminuyó a medida que aumentó el número de contactos, siendo las simulaciones con $N = 800$ monómeros las que presentaron una menor energía total al finalizar estas simulaciones. Igualmente se observó la dependencia con la concentración ya que a medida en que aumentó el número de monómeros en el sistema, mayor fue el número de contactos los cuales favorecieron la disminución de la energía total del sistema. Esta última fue obtenida como la sumatoria de los aportes energéticos de cada uno de los contactos encontrados durante cada simulación, los cuales fueron dependientes del grado de orientación de cada monómero en el i -ésimo dímero.

En la Figura 27 se muestra la primera derivada de la energía total con respecto a los ciclos de iteración calculada a partir de los resultados presentados en la Figura 26 (imagen derecha) y poder determinar la convergencia de la energía a lo largo de cada simulación. A medida que aumentó el número de monómeros también se observó un aumento en el número de ciclos necesarios para que la energía total del sistema de muestreo no cambiara significativamente entre una configuración y la anterior.

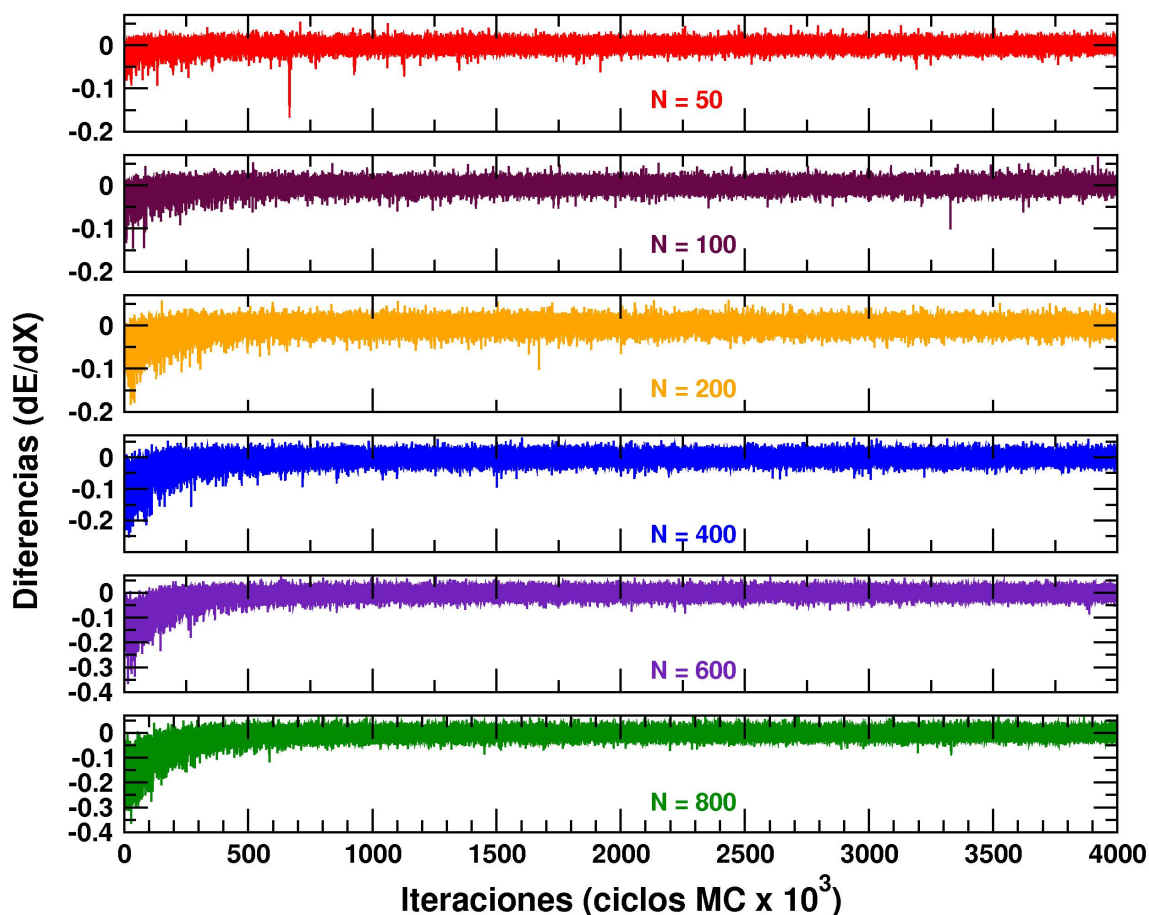


Figura 27. Resultados de la primera derivada de la energía para los distintos casos de N a una temperatura de 310 K.

Para $N = 50$ la energía total del sistema se estabilizó rápidamente al cabo de 1×10^5 ciclos de muestreo, mientras que para $N = 800$ la energía se estabilizó después de 1×10^6 iteraciones. Para las simulaciones con $N = 100$ hasta $N = 600$ la energía total del sistema se estabilizó entre 2.5 - 5.0×10^5 ciclos de muestreo. Como se puede observar las

fluctuaciones de la energía fueron altas al comienzo de cada simulación debido a que los distintos monómeros distribuidos en la red cúbica entraran en contacto con uno o varios vecinos disminuyendo progresivamente la energía total.

Cuando el número total de contactos para cada simulación alcanzó un máximo, la movilidad de los diferentes monómeros fue prácticamente nula. Esto se debió a que las energías de interacción para todas las orientaciones desarrolladas fueron menores de cero. En otras palabras, la salida de un monómero desde la fase amiloide hacia un punto en el espacio donde no hayan contactos implica que $\Delta E > 0$. De acuerdo con el esquema de muestreo, se determina si el peso estadístico de la probabilidad de transición cumple con los requisitos de aceptar la nueva configuración para que en principio el monómero involucrado pueda pasar a la fase acuosa. Sin embargo, para las simulaciones con $T = 310K$ no se observaron fluctuaciones entre la fase amiloide y la fase acuosa al final de cada muestreo. Esto se debió a que el costo energético fue elevado para aceptar la nueva configuración.

Bajo las mismas condiciones N, T el número de contactos fueron ligeramente diferentes debido a que cada una de las configuraciones de partida fueron independientes. De esta manera se obtuvieron diferentes espacios de muestreos. Sin embargo, en todas las simulaciones se observaron dos aspectos característicos: (1) El número de contactos aumentó en función de la cantidad de monómeros. Esto se debió a la disminución de los puntos reticulares disponibles para que cada monómero pudiera moverse de un lugar a otro presentando una mayor posibilidad de entrar en contacto con otro monómero y generando un nuevo par de monómeros vecinales. (2) La distribución del número de contactos en todos los casos fue de tipo logarítmico, alcanzando un valor máximo que fue dependiente de la concentración de monómeros de $\beta 2m$.

Aunque la temperatura no es usualmente empleada para analizar la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$, este parámetro ha sido considerado en estas simulaciones para analizar el efecto causado sobre el número total de contactos. En la Figura 28 se mues-

tra la energía total empleando cuatro distintos valores de temperatura ($T = 100$ K, 310 K, 500 K y 700 K).

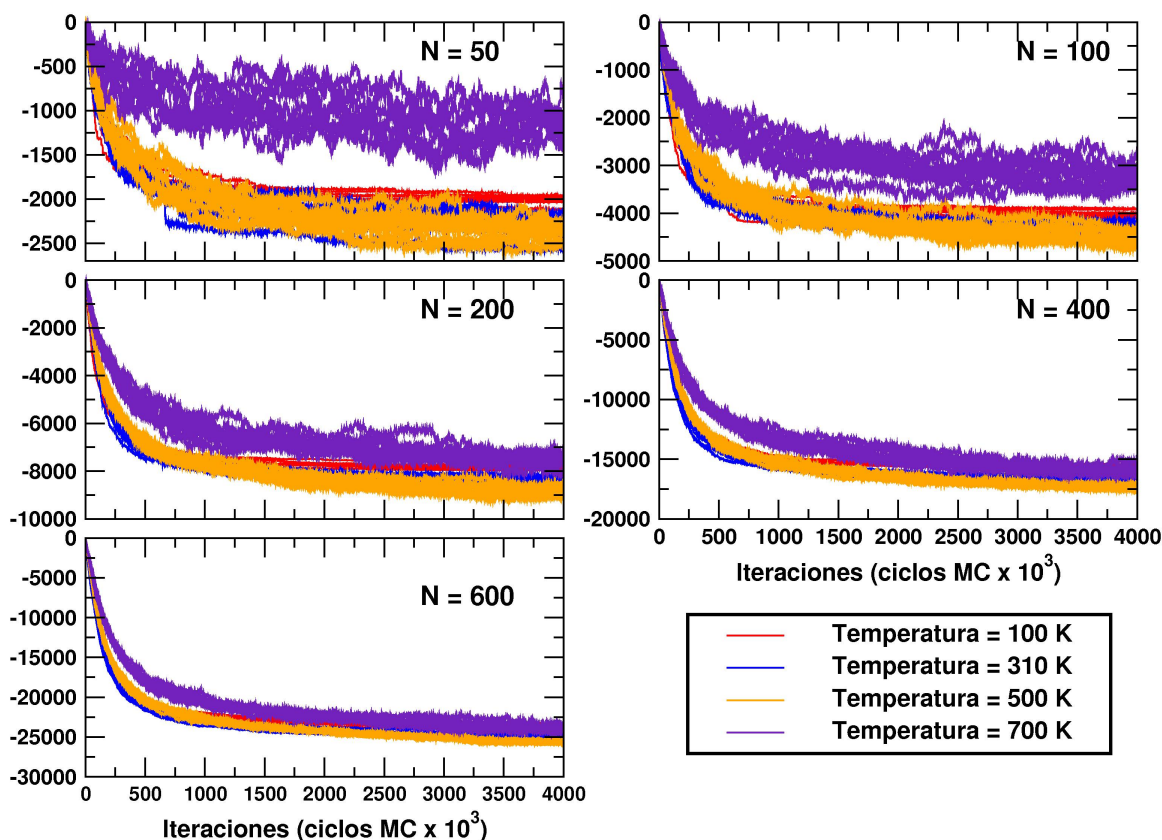


Figura 28. Valores de energía total de las simulaciones de dinámica a diferentes condiciones de temperatura y número de monómeros por celda.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 28, la energía total del sistema sigue siendo función de la concentración hasta alcanzar un mínimo. Cuando se desarrollaron simulaciones a baja temperatura ($T = 100$ K), las fluctuaciones en la energía fueron menores indicando que cada monómero al entrar en contacto con la fase amiloide difícilmente se desorben.

Cuando se aumentó la temperatura (hasta 700 K) ocurrió el caso contrario, se observaron mayores fluctuaciones en la energía total. Esto tuvo como consecuencia el aumento en la probabilidad de desorción que puede sufrir un monómero desde la fase amiloide, impidiendo el proceso de crecimiento de los distintos centros de nucleación. Para $N = 50$, $N = 100$ y $N = 200$ se observó una separación de la energía de los dis-

tintos grupos de simulación; mientras que para $N = 400$ y $N = 600$ para los distintos valores de temperatura se alcanzaron valores de energía total cercanas.

El número de contactos en función de la cantidad de monómeros y la temperatura se presentan en la Figura 29. Así como la energía total del sistema fue afectada por la temperatura, la misma situación ocurrió para el caso del número total de contactos. Para $N = 50$ y $N = 100$ las fluctuaciones fueron mayores a 700 K. El número de contactos varió entre 15 y 45 para $N = 50$, mientras que para $N = 100$ varió entre 50 y 100. En comparación con las otras temperaturas empleadas (100 K, 310 K y 500 K) se observó que los valores fueron relativamente cercanos. En otras palabras, el efecto causado por la temperatura sobre el número de contactos fue mayor únicamente a 700 K. A medida que aumentó la cantidad de monómeros, la energía total para las distintas temperaturas fueron cercanas.

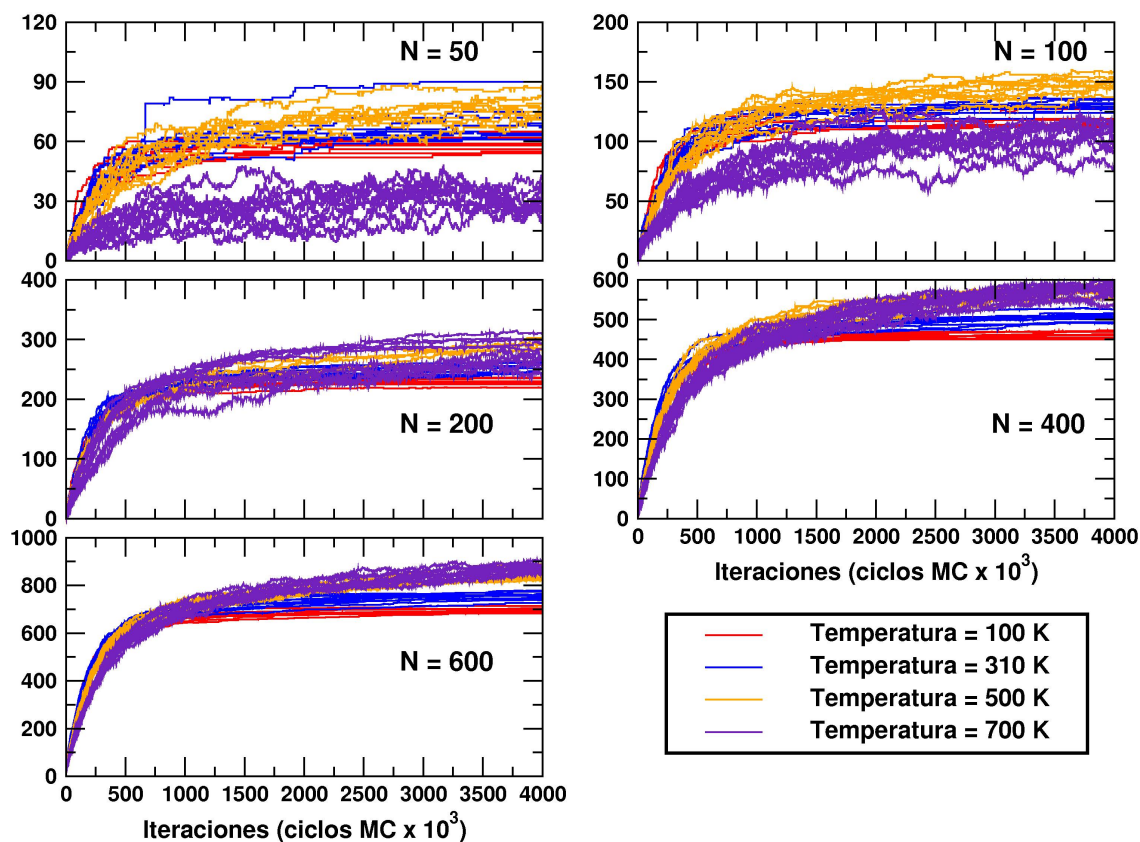


Figura 29. Valores obtenidos del número de contactos empleando diferentes temperaturas y cantidad de monómeros.

La temperatura de desnaturalización de proteína $\beta 2m$ libre es de 336 K, mientras que la $\beta 2m$ con cobre es de 334 K [100]. Es decir por encima de los 500 K, ambas proteínas se encuentran en estado desnaturalizado. Debido a que todos los monómeros fueron considerados como partículas rígidas, los aspectos conformacionales a altas temperaturas fueron omitidas en nuestro modelo teórico y por lo tanto el proceso de asociación bajo estas condiciones es mucho más complejo.

5.2.2 Velocidad de formación de intermediarios oligoméricos

Como se mencionó anteriormente, todas las simulaciones variando tanto la cantidad de monómeros de $\beta 2m$ como la temperatura avanzaron progresivamente en la dirección de menor energía como consecuencia del aumento del número de contactos. Todas las simulaciones partieron de una distribución aleatoria de monómeros que, posteriormente, formaron asociaciones las cuales permitieron obtener los distintos intermediarios oligoméricos hasta alcanzar un tamaño máximo. Adicionalmente se observó que a medida que aumentó la concentración de monómeros $\beta 2m$ también aumentó el número de contactos; mientras que a medida que aumentó la temperatura, el número de contactos disminuyó con excepción para las simulaciones empleando $N = 50$ y $N = 100$.

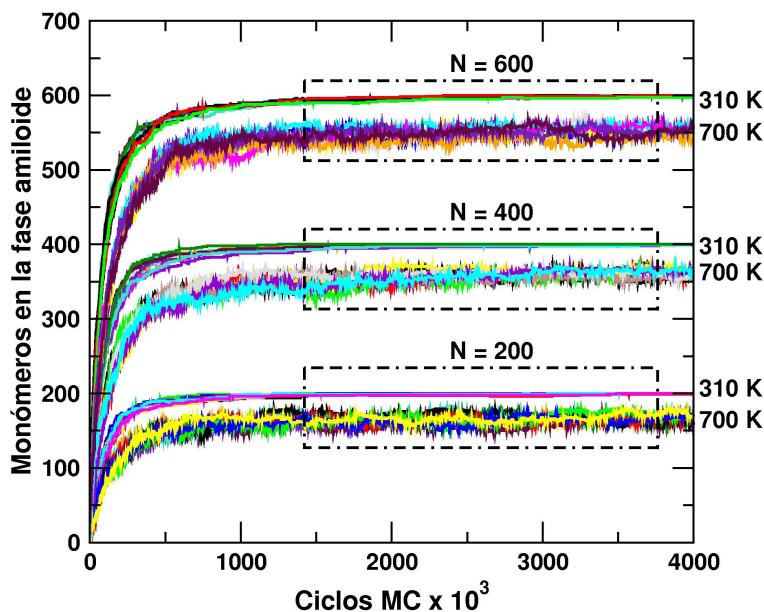


Figura 30. Gráfica de la cantidad de monómeros de $\beta 2m$ involucrados en la formación de los intermediarios oligoméricos para los distintos casos de N a 310 K y 700 K.

A partir del número de contactos calculados se analizó la distribución de monómeros en los distintos oligómeros obtenidos a lo largo de cada simulación. Los resultados se muestran en la Figura 30, los cuales revelaron dos aspectos importantes para todas las simulaciones: (1) En la fase inicial de cada simulación la cantidad de monómeros entre cada ciclo mostró un comportamiento quasi-lineal en donde la pendiente representó la velocidad de asociación y aumentó a medida que la concentración de proteínas aumentaba. (2) En la etapa final de cada simulación, el número de monómeros involucrados en la formación de los distintos centros de nucleación permaneció constante y alcanzando valores máximos del número de monómeros totales para los distintos casos. Este último aspecto indicó el consumo total o parcial de monómeros libres que permitieron obtener la correspondiente fase amiloide.

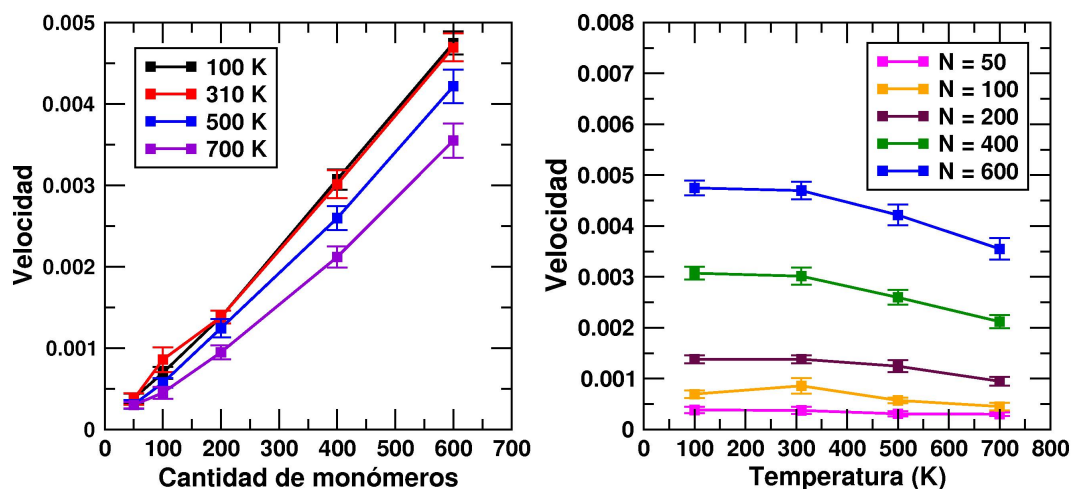


Figura 31. Resultados de la velocidad inicial de asociación de monómeros de $\beta 2m$ en función de la concentración y al temperatura.

La facilidad con la que se llevaron a cabo las asociaciones de proteínas de $\beta 2m$ fue analizada en términos de la velocidad inicial calculada como el cambio del número de monómeros por ciclos de simulación aplicados sobre los primeros 1×10^5 ciclos MC debido a que en esta región se obtuvo una mejor linealidad de los datos. Los resultados se presentan en la Figura 31 en donde se muestra el efecto tanto de la concentración (imagen derecha) como la temperatura (imagen derecha) sobre las velocidades iniciales de asociación. Las bandas verticales en ambas gráficas representan la desviación estándar obtenidas a partir de diez simulaciones independientes para cada caso. Únicamente se

muestran los resultados para $N = 100, 200, 400, 600$ ya que en el caso de $N = 800$ no se desarrollaron simulaciones a distintas temperaturas.

Para los distintos casos en que la temperatura permaneció constante se observó que a medida que aumentó la concentración, la velocidad inicial de asociación aumentó linealmente según se muestra en la imagen superior izquierda (ver Figura 31). Es decir, a medida que el número de monómeros por unidad de volumen era mayor, el espacio disponible para que una proteína $\beta 2m$ se desplazara en cualquier dirección disminuyó y por tal razón el número de eventos asociados a la formación de los primeros dímeros aumentó en cada ciclo de simulación.

En términos energéticos implicó que cada una de las nuevas configuraciones que se obtenían al inicio de cada simulación fueron controladas principalmente por procesos de adsorción en donde la incorporación de un monómero libre hacia la obtención de intermediarios oligoméricos siempre involucraba un descenso en la energía total del sistema, la cual fue independiente de la orientación relativa de cada par de proteínas. Esta disminución de la energía implicó que la probabilidad con la que ocurría una transición ($W_{a \rightarrow b} \propto e^{-\Delta E/k_B T}$) fue mayor a uno.

Las velocidades iniciales de asociación en función de la temperatura se presentan en la imagen derecha de la Figura 31. En contraste con el efecto de la concentración, a medida que aumentó la temperatura la velocidad de asociación disminuyó. Sin embargo en el caso de $N = 100$ se observó un aumento de la velocidad de asociación a 100 K y a 300 K y posteriormente este parámetro descendió al cabo de 500 K. El efecto de la temperatura sobre la velocidad de asociación se vió reflejado en el hecho de que a medida que aumentó, la probabilidad de los eventos de desorción fueron mayores impidiendo que cada uno de los monómeros permaneciera en la fase amiloide e impidiendo el crecimiento de dicha fase.

Aunque la mayoría de trabajos relacionados con la fibrillogénesis de $\beta 2m$ no han sido en-

focados en términos del efecto de la concentración y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de dichas fibras, Miranker *et al.* analizaron únicamente la dependencia de la velocidad de formación de intermediarios oligoméricos en función de la concentración tanto del cobre como de la proteína a condiciones fisiológicas de pH y temperatura [79]. Con base en sus resultados, Miranker y colaboradores plantean que la velocidad de formación de intermediarios oligoméricos no depende ni de la concentración de cobre ni de la concentración de la proteína. En este sentido, estos autores suponen que la independencia de la velocidad de formación de intermediarios oligoméricos en función de la concentración de ambas especies obedece a un proceso unimolecular como consecuencia de cambios conformacionales sobre el aa Pro32 (M^*) (transición *cis-trans*) promovidos por la incorporación de iones de cobre en la His32. Sin embargo, el paso determinante de este proceso no corresponde a la incorporación del cobre en la $\beta 2m$ ($M - Cu^{+2}$), sino a la transición entre $M - Cu^{+2} \rightarrow M^*$. En la Figura 32 se muestra el esquema propuesto por Miranker.

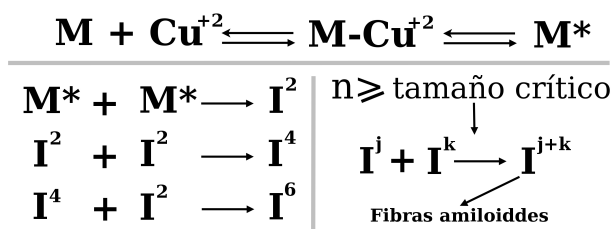


Figura 32. Esquema propuesto por Miranker *et al.* para la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$ en presencia de cobre y bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

Caso contrario ocurre cuando la fibrilogénesis de la $\beta 2m$ se realiza a pH ácido, en donde Radford *et al.* observaron que la velocidad de formación de estos depósitos presentó una dependencia lineal con la concentración de proteínas $\beta 2m$ [101] y estableciendo que la cinética de formación de fibras amiloides de $\beta 2m$ es de primer orden.

Aunque en el presente trabajo se analizó la formación de depósitos amiloides teniendo en cuenta la presencia de cobre y bajo las condiciones fisiológicas de pH y temperatura, los resultados obtenidos fueron cualitativamente similares a los encontrados por Radford y colaboradores. Esta discrepancia entre lo reportado experimentalmente por

Miranker *et al.* y los obtenidos a través del modelo teórico desarrollado en este caso, posiblemente obedece a que no fueron considerados aquellas posibles perturbaciones estructurales al interior de la $\beta 2m$ como consecuencia de la incorporación del cobre.

En el caso del efecto de la temperatura, no se encuentran en la literatura reportes para el caso específico de la $\beta 2m$ nativa. Sin embargo, la dependencia de la velocidad de asociación en función de la temperatura ha sido estudiado por diversos autores empleando diferentes proteínas tales como la amiloide- β , insulina, prion Ure2p e inclusive la variante P5G de la $\beta 2m$ [102–105]. Los resultados reportados en estos casos sugieren que la velocidad de asociación en función de la temperatura se divide en dos regiones claramente diferenciadas. La primera región corresponde a bajas temperaturas (276–320 K) en donde la velocidad de asociación aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo; mientras que la segunda región que corresponde a elevadas temperaturas (>320 K) la velocidad de asociación decae exponencialmente (ver Figura 33).

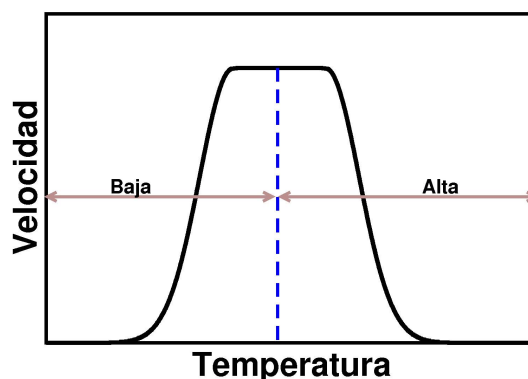


Figura 33. Resultados de la dependencia de la velocidad inicial de formación de oligómeros intermedios con la temperatura.

En comparación con los resultados obtenidos en este trabajo, este comportamiento gaussiano únicamente se observó en el caso para $N = 100$ el cual presentó un ligero aumento de la velocidad de asociación en el rango de 100-310 K (ver Figura 31). Para los restantes caso de N en el mismo rango de temperatura se observó un ligero descenso de la velocidad de asociación. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo son cualitativamente similares a los encontrados por Muthukumar *et al.* [99] y Hall *et al.* [106] quienes emplearon modelos teóricos para analizar la fibrillogénesis de distintos

péptidos.

Como se comentó anteriormente, otro aspecto relevante que se observó fue la participación de los distintos monómeros durante la formación de la fase amiloide y su dependencia con la temperatura y la concentración (ver Figura 30). El efecto de la temperatura para las simulaciones empleando diferentes cantidad de monómeros se describe a continuación. Para $N = 50$, el porcentaje de monómeros libres que se consumieron en función de la temperatura fueron 100% \rightarrow 100 K; 99.80% \rightarrow 310 K; 96.40% \rightarrow 500 K y 57.80% \rightarrow 700 K (datos no son mostrados).

De acuerdo con lo anterior, aunque a temperaturas de 100 K, 310 K y 500 K la cantidad de monómeros involucrados en la formación de la fase amiloide fue muy cercana, se logró observar un pequeño descenso a medida que la temperatura aumentó; mientras que a 700 K, este valor disminuyó drásticamente. Este comportamiento fue similar para los casos de $N = 100, 200, 400$ y 600 monómeros en donde el número de monómeros consumidos durante la formación de la fase amiloide aumentó en función de la concentración.

Analizando las simulaciones a 700 K, los porcentajes de monómeros en función de la cantidad de monómeros fueron 57.80% \rightarrow $N = 50$; 70.80% \rightarrow $N = 100$; 82.95% \rightarrow $N = 200$; 87.70% \rightarrow $N = 400$ y 92.32% \rightarrow $N = 600$ indicando que a medida que aumentó la concentración de β 2m también aumentó el porcentaje de monómeros en la nueva fase amiloide.

5.2.3 Tiempo de latencia en función de la temperatura y la concentración

El tiempo de latencia (lag time) se define como el periodo de tiempo transcurrido hasta observar la aparición de los primeros intermedios oligoméricos y usualmente es calculado mediante datos obtenidos por fluorescencia de tioflavina T. Bajo el contexto de los procesos dependientes de nucleación es aceptado que durante este tiempo la formación de fibras amiloides es precedida por la obtención de intermediarios oligoméricos hasta

alcanzar un tamaño crítico.

En particular, el tiempo de latencia en función de la concentración ha sido ampliamente usado para determinar el mecanismo por el cual ocurre la formación de fibras amiloides. En la actualidad, cuatro modelos de formación de fibras amiloides han sido propuestos por diversos autores. El primero es denominado modelo de acoplamiento a un molde (en inglés es conocido como templated assembly - TA), en el cual un monómero se adiciona a un núcleo previamente ensamblado [107, 108]. El segundo es el modelo de conversión directa (monomer-directed conversion - MDC), que se caracteriza por varias fases: i) cambios conformacionales de un monómero el cual migra desde un estado nativo **S** hacia un estado de tipo amiloidogénico **A**; ii) colisión entre un monómero **S** con un monómero **A**, en donde el monómero **S** adquiere la misma conformación del monómero **A**; iii) asociación de dos monómeros **A** hasta obtener la respectiva fibra amiloide [109]. El tercero es el modelo de polimerización nucleada (nucleated polymerization - NP) en donde la etapa determinante se caracteriza por la formación de un núcleo crítico, seguido de una rápida adición de monómeros hasta obtener la fibra amiloide [110]. El último modelo es conocido como conversión conformacional nucleada (nucleated-conformational conversion - NCC), el cual incorpora aspectos de los modelos TA y NP con características adicionales [111]. El modelo NCC sugiere que la etapa determinante de la fibrillogénesis corresponde a la formación de pequeños agregados amorfos de tamaño crítico y posteriormente conducen a la formación de las fibras amiloides [111].

De todos los mecanismos de nucleación anteriormente descritos, los modelos NP y NCC son, en la actualidad, los más aceptados ya que describen adecuadamente muchos procesos de formación de fibras amiloides para diferentes proteínas [110–118]. Aunque estos modelos son similares, ellos pueden ser diferenciados a partir del tiempo de latencia en función de la concentración de proteínas. Para el caso del modelo NP, el tiempo de latencia presenta un decaimiento exponencial en función de la concentración o también un decaimiento lineal del logaritmo del tiempo de latencia en función del logaritmo de la concentración [110]; mientras que el modelo NCC establece que el tiempo de latencia

es independiente de la concentración [111].

En el caso particular de la fibrilogénesis de la $\beta 2m$ existen evidencias experimentales en donde demuestran que la formación de intermedios oligoméricos para esta proteína ocurre de manera discreta; es decir, a través de la formación de dímeros, tetrameros y hexámeros [79, 80]. Este último oligómero, formado por seis proteínas $\beta 2m$ corresponde al núcleo crítico que es responsable de la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$ [79, 80]. Bajo esta consideración, el cálculo del tiempo de latencia se llevó a cabo determinando el número de ciclos MC necesarios hasta observar la aparición de centros de asociación y cuyo tamaño fue de $n_I = 6$. Para el caso del efecto de la temperatura, únicamente se calculó para $T = 310\text{ K}$ y $T = 700\text{ K}$ para las distintas concentraciones empleadas; mientras que para el caso del efecto de la concentración se realizaron cálculos para $N = 400, 600$ y temperaturas de 310 K y 700 K . Los resultados se muestran en la Figura 34 (a y c).

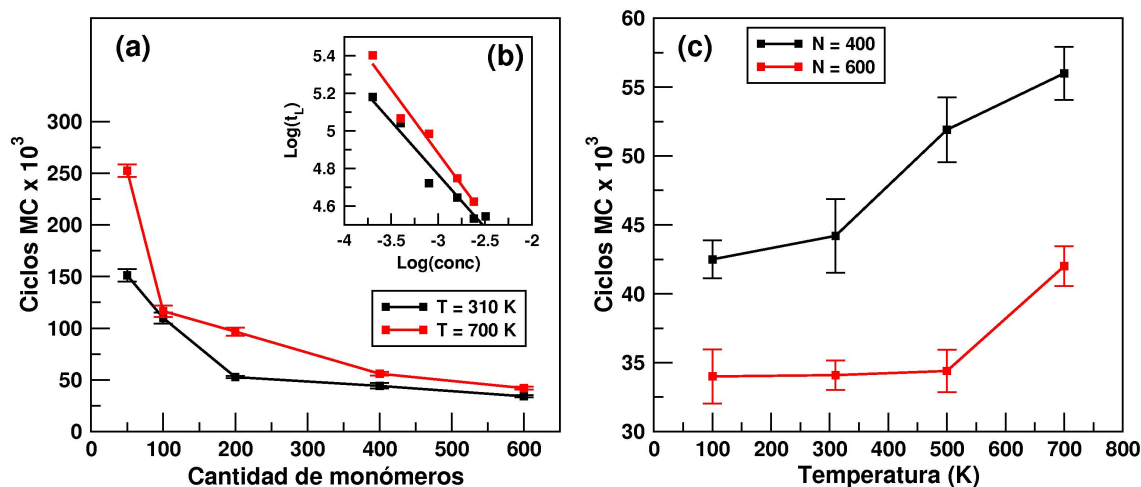


Figura 34. Resultados del tiempo de latencia en función de la concentración y la temperatura obtenidas para las simulaciones de dinámica.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 34, el tiempo de latencia igualmente presentó una dependencia con la concentración y la temperatura. En el caso de la concentración y empleando temperaturas de 310 K y 700 K , se observó un decaimiento exponencial a medida que aumentaba la concentración (Figura 34a). En concordancia con los valores de velocidad inicial, a medida que aumentó la cantidad de monómeros

por unidad de volúmen, la formación de oligómeros ocurre en una menor cantidad de ciclos MC mediados por procesos de adsorción que permitieron la formación del hexámero que es el núcleo crítico para la formación de la fase amiloide.

Caso contrario ocurrió cuando se analizó el efecto de la temperatura sobre el tiempo de latencia en la cual se observó un aumento exponencial para los distintos casos de la cantidad de monómeros la cual fue asociada al hecho de que en términos de estas condiciones, los procesos de desorción priman sobre los procesos de adsorción impidiendo la formación de la fase amiloide provocando un aumento del tiempo de latencia y la disminución en la velocidad inicial de asociación.

Partiendo de este razonamiento se puede establecer las siguientes relaciones: a) A medida que aumentó la concentración, aumentó la velocidad inicial de asociación y disminuyó el tiempo de latencia ($C_o \uparrow, v \uparrow, t_L \downarrow$). b) A medida que aumentó la temperatura, la velocidad inicial de asociación disminuyó y aumentó el tiempo de latencia ($T \uparrow, v \downarrow, t_L \uparrow$). Este último es válido para el caso cuando se trabaja a altas temperaturas como lo demuestran las diferentes evidencias experimentales [104].

De acuerdo con las observaciones descritas anteriormente, los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con el modelo de polimerización nucleada (NP), el cual predice un decaimiento exponencial del tiempo de latencia en función de la concentración ($t_L \propto \exp(-C)$) para ambas temperaturas empleadas ($T = 310K$ y $T = 700$). Ello implica que los resultados obtenidos en este trabajo presentaron cualitativamente una similitud con los reportados por Radford y colaboradores [101] quienes observaron que el tiempo de latencia decae exponencialmente en función de la concentración a condiciones de pH ácido y temperatura ambiente; es decir, mediada a través de un mecanismo NP.

5.2.4 Formación y distribución de oligómeros intermedios

En esta sección se describe los resultados relacionados con la formación y distribución de oligómeros intermedios que preceden a la formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$. A continuación se presentan los resultados obtenidos empleando los diferentes valores de la cantidad de monómeros a una temperatura de 300 K. Al finalizar esta sección se describe brevemente los resultados relacionados con el efecto de la temperatura en la distribución de los monómeros en los distintos oligómeros.

Como se mencionó en varias oportunidades, todas las simulaciones iniciaron con una distribución aleatoria de monómeros en las diferentes direcciones de la caja cúbica donde fueron confinados. Es decir que todos los sistemas evaluados fueron poblados mayoritariamente por monómeros. A medida que avanzó cada simulación, los monómeros se desplazaron aleatoriamente hasta entrar en contacto con otro monómero formando el dímero que correspondió al oligómero intermedio más sencillo. En la Figura 35 se muestra la distribución promedio de monómeros en los diferentes oligómeros para los distintos casos de N y una temperatura de 310 K para diez simulaciones independientes.

Como se puede apreciar en esta4 imagen, a medida que aumentó la cantidad de monómeros, el número de monómeros involucrados en la formación de los distintos oligómeros fue mayor. En la Figura 35a se presenta la distribución promedio de monómeros al transcurrir 5×10^4 ciclos de simulaciones. Durante esta etapa, se observó la aparición de diferentes oligómeros cuyo tamaño variaron entre 2 a 6 monómeros. Para $N = 50$, la poblaciones de monómeros se encontraron distribuidos únicamente entre su estado libre y dímeros. para $N = 200$, se observó la formación de dímeros y trímeros; para $N = 200$ y $N = 400$ se detectaron adicionalmente tetrámeros; mientras que para $N = 600$ y $N = 800$ se observó la formación de las especies anteriores mas la aparición de pentámeros y hexámeros. Al cabo de 2.5×10^5 ciclos MC las poblaciones de oligómeros cambiaron drásticamente en comparación con las configuraciones, según se muestra en la Figura 35b. Más del 50% de los monómeros que inicialmente estaban libres se encontraron formando asociaciones representadas en los diferentes dímeros, trímeros,

tetrámeros, etc; los cuales aumentaron con la concentración. Mientras que para $N = 50$ se han formado hasta tetrámeros, en el resto de los casos se observó oligómeros intermedios cuyo tamaño fue superior a seis monómeros. Para $N = 100$ se evidenció la formación de hexámeros y octámeros; mientras que para $N = 200, 400, 600, 800$ se observaron oligómeros cuyos tamaños fueron superiores a 10 monómeros. En el caso de $N = 800$ presentó oligómeros de tamaños que superaron las 20 unidades.

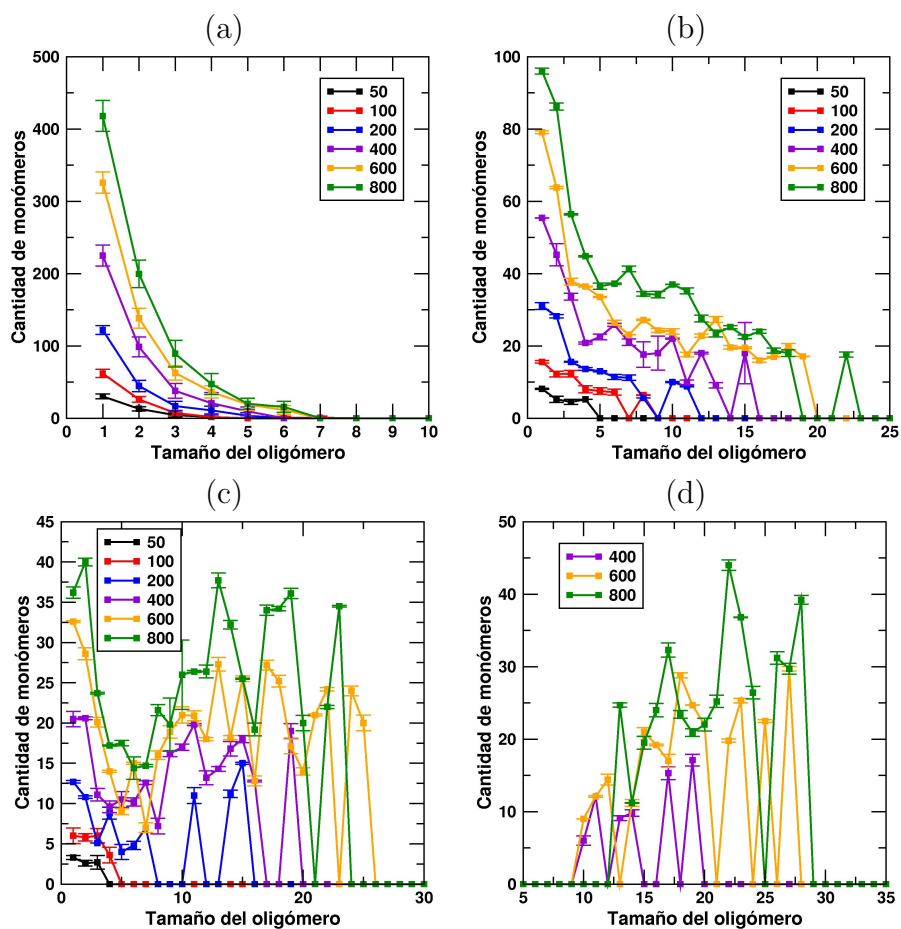


Figura 35. Resultados obtenidos de la distribución de oligómeros intermedios en diferentes ciclos de simulación para los distintos valores de N y a 310 K de temperatura. (a) 5×10^4 ciclos MC, (b) 2.5×10^5 ciclos MC, (c) 5×10^5 ciclos MC, (d) 4×10^6 ciclos MC.

En la medida que avanzaron las simulaciones, la población de dímeros, trímeros, tetrámeros disminuyó en la medida en que estos se asociaron para formar especies de mayor tamaño. Al finalizar cada simulación el tamaño de cada una de las asociaciones de mayor tamaño no disminuyó, indicando la formación de estas asociaciones ocurren de manera irreversible. Adicionalmente se observó que la totalidad de la población de monómeros

libres desapareció como consecuencia de la obtención de los diferentes oligómeros según se observa en la Figura 35d.

Debido a que se realizaron diez simulaciones independientes para cada caso de N , la distribución de los oligómeros no fue igual presentando desviaciones estándar elevadas y cuyo valor promedio estuvo por debajo del tamaño de algunos oligómeros. Por tal motivo, no se presentaron los resultados para $N = 50, 100$ y 200 . Es decir, se observó una variación en el tamaño final de estas especies intermedias hasta alcanzar los correspondientes tamaños máximos. Para los casos de $N = 400, 600, 800$, el promedio de las poblaciones varió entre $n = 10$ y $n = 28$ y el tamaño máximo de las asociaciones al final de estas simulaciones fueron dependientes de la concentración de la proteína $\beta 2m$ (datos no mostrados).

Vachet *et al.* y Miranker *et al.* establecen que la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$ a condiciones de pH neutro, temperatura cercana a la fisiológica y cantidades estequiométricas de cobre es precedida por la aparición de dímeros, tetrámeros y hexámeros; mientras que la formación de trímeros, pentámeros, etc no es detectada experimentalmente [79, 80]. Por tal razón, estos autores plantean que la formación de los oligómeros intermedios ocurre de manera discreta. Caso contrario se observó en los resultados obtenidos en este trabajo en donde la formación de trímeros y heptámeros ocurrió para los distintos casos de N según se muestra en la Figura 36.

Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la formación de trímeros, heptámeros, nonámeros a partir de la adiciones de monómeros a dímeros, asociaciones trímeros-dímeros para obtener los correspondientes oligómeros impares. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Radford *et al.* quienes detectaron estas mismas especies empleando espectrometría de masas para analizar la fibrillogénesis de la proteína $\beta 2m$ a pH ácido, una temperatura de 310 K y sin la presencia de cobre [60].

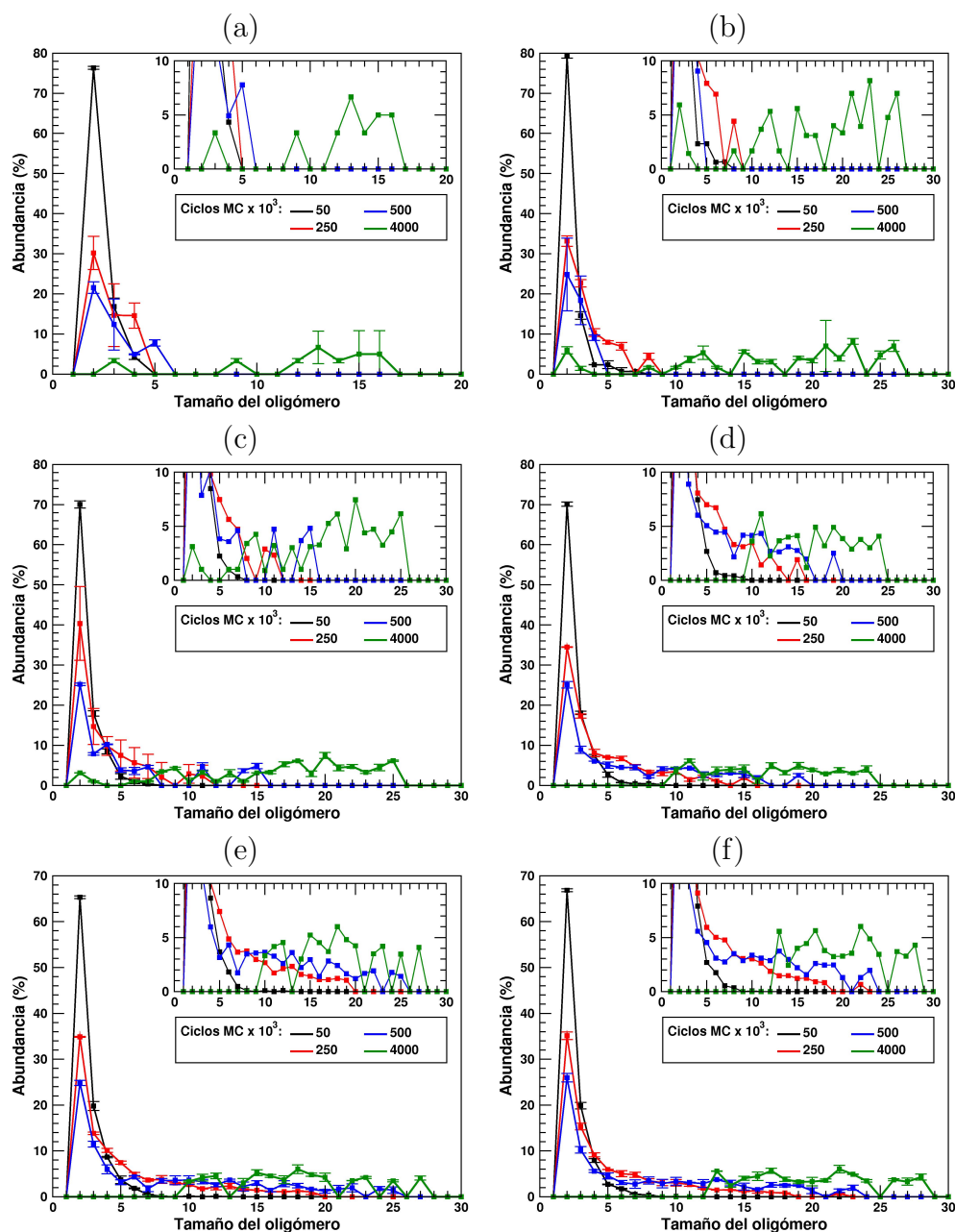


Figura 36. Resultados obtenidos de los porcentajes de abundancia de los diferentes oligómeros intermedios para los distintos casos de N y 310 K de temperatura. (a) $N = 50$, (b) $N = 100$, (c) $N = 200$, (d) $N = 400$, (e) $N = 600$, (f) $N = 800$.

En términos de la distribución de las distintas clases de proteínas $\beta 2m$ ($\beta 2m_L$ y $\beta 2m_C$) se observó que a medida que avanzaron todas las simulaciones, los porcentajes de distribución fueron significativamente cercanos indicando que la concentración no influyó en la presencia o ausencia de iones cobre a lo largo de la formación de los distintos oligómeros y posteriormente los depósitos amiloides de $\beta 2m$ (ver Figura 37). Este com-

portamiento obedece a que las interacciones $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$ evaluadas en la primera etapa de este proyecto presentaron los menores valores de energía de interacción, como es el caso de F1:F1_5, F3:F3_3, F5:F5_3.

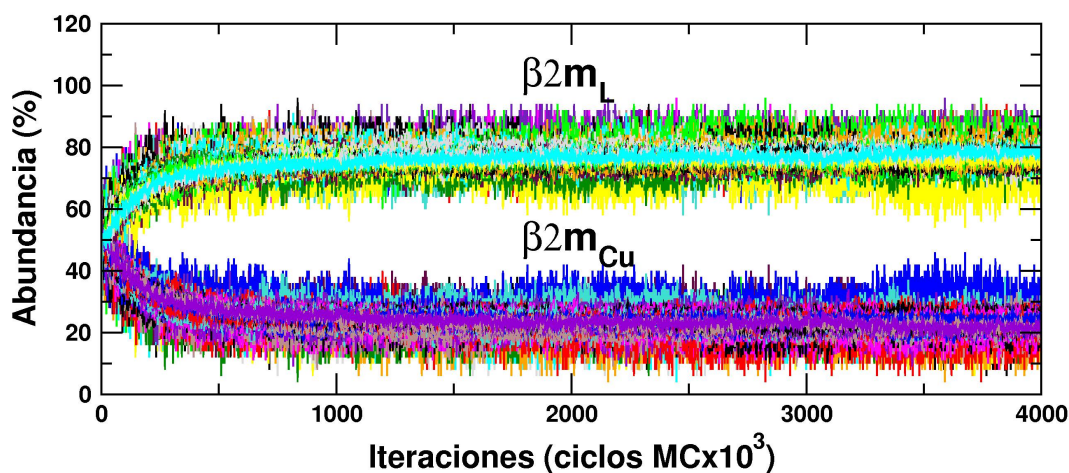


Figura 37. Resultados de los porcentajes de distribución de las dos clases de proteínas $\beta 2m$ ($\beta 2m_L$ y $\beta 2m_{Cu}$ para $N = 600$ y distintos valores de temperatura ($T = 100$ K, 310 K, 500 K y 700 K).

Al igual que la velocidad inicial de asociación y el tiempo de latencia, la distribución de oligómeros intermedios también fueron dependientes de la concentración y la temperatura. En la Figura 38 se presentan los resultados correspondientes a las simulaciones empleando $N = 600$ en las distintas temperaturas (100 K, 310 K, 500 K y 700 K). Para cuatro distintos ciclos de simulaciones se llevó a cabo el análisis. 5×10^4 ciclos MC (Figura 38a), 5×10^5 ciclos MC (Figura 38b) y 4×10^6 ciclos MC (Figura 38c).

Según los resultados presentados en la Figura 38, claramente se observa que hubo una dependencia de la formación de los distintos oligómeros a medida que aumentó la temperatura. En los primeros 5×10^4 ciclos MC, la distribución de oligómeros fue relativamente la misma. Sin embargo, al cabo de 5×10^5 ciclos MC (Figura 38b) fueron evidentes las distintas distribuciones de estas especies para cada valor de temperatura. Mientras que para $T = 100$ se observó que aún prevalecieron alrededor de 20 monómeros en estado libre, en el caso de $T = 700K$ persistieron aproximadamente 89 monómeros indicando que a altas temperaturas los procesos de desorción impidieron el crecimiento de los distintos oligómeros. A 310 K se observó una mayor distribución de oligómeros

que variaron entre $n = 4$ y $n = 25$ mientras que temperatura superiores a 310 K el tamaño de los oligómeros varió en $n = 2$ y $N = 20$ para el caso de 700 K; mientras que para $T = 500K$ se logró observar oligómeros de $n = 27$.

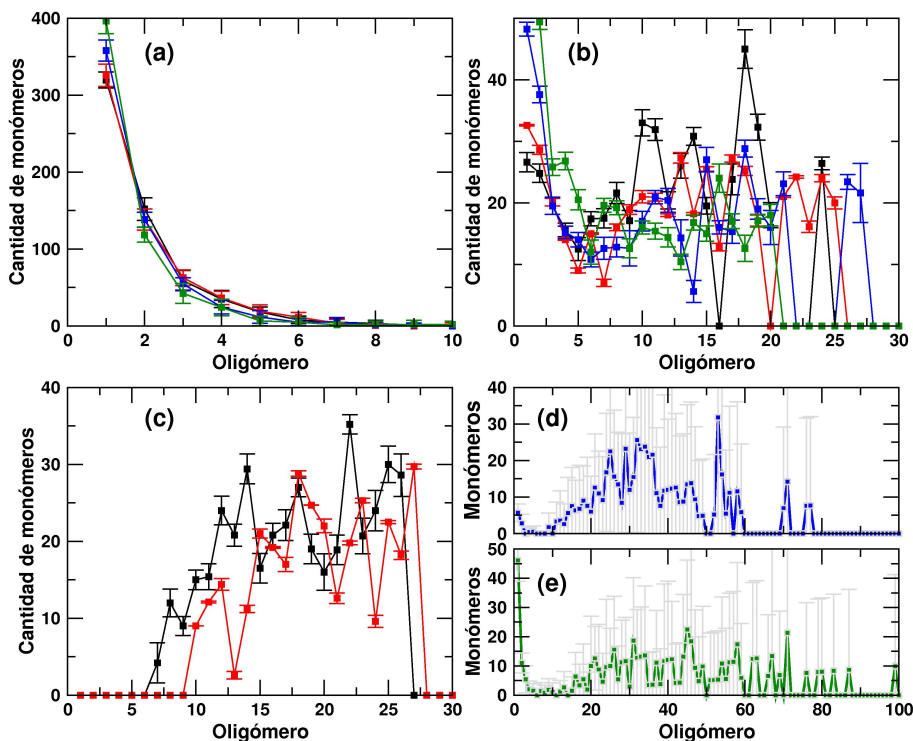


Figura 38. Perfiles de distribución de oligómeros intermedios para $N = 600$ en función de la temperatura.

Finalizadas estas simulaciones (4×10^6 ciclos MC) se observó que para los casos de $T = 100$ y $T = 310K$ la distribución de oligómeros fueron relativamente similares; a 310 K se observó la aparición de oligómeros con $n = 28$; mientras que para $T = 100K$ se observó oligómeros con $n = 27$ indicando el efecto de la temperatura sobre el tamaño máximo de los respectivos oligómeros. Para $T = 500$ y $T = 700K$ se presentan los resultados en las imágenes (d) y (e) los cuales presentaron una mayor desviación estándar ya que las 10 simulaciones independientes para este caso presentaron distribuciones de oligómeros significativamente diferentes.

5.2.5 Morfología de los depósitos amiloides de $\beta 2m$

En esta sección se describen los resultados relacionados con la morfología de los depósitos amiloides de $\beta 2m$ para todos los casos en que se varió la cantidad de monómeros a una temperatura de 310 K. En la Figura 39 se muestran las imágenes tridimensionales para diferentes instantes de una simulación para el caso de $N = 50$ y 310 K de temperatura.

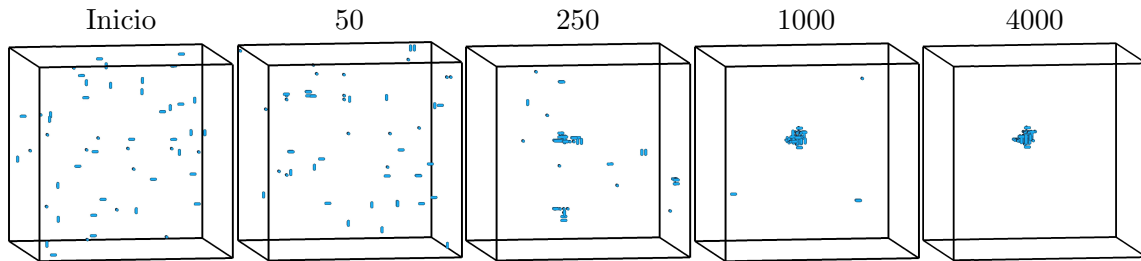


Figura 39. Imágenes tridimensionales de la evolución de las simulaciones de dinámica para distintos ciclos de simulación (ciclos MCx10³) para $N = 50$ y 310 K de temperatura.

Como se puede apreciar, la configuración inicial presentó una distribución aleatoria en donde este sistema fue poblado mayoritariamente por las dos clases de proteína $\beta 2m$. Cada monómero se difundió en las distintas direcciones de la caja hasta asociarse con otros monómeros para formar oligómeros de cadena corta (dímeros). A medida que avanzó la simulación se puede apreciar los distintos oligómeros (dímeros y trímeros) que han sido formado al cabo de 50x10³ ciclos MC. En esta etapa, procesos competitivos de adsorción/desorción condujeron a la formación de oligómeros de mayor tamaño. Al cabo de 1x10⁶ ciclos MC se puede apreciar como se fueron agregando los distintos monómeros y oligómeros hasta la obtención de 1 depósito amiloide de tipo amorfo como se puede observar en la Figura 39 al cabo de 4x10⁶ ciclos MC.

Sin embargo, las distintas simulaciones para $N = 50$ no mostraron la misma cantidad de depósitos amiloides de $\beta 2m$. En la Figura 40 se muestran las representaciones tridimensionales para las diez simulaciones independientes para $N = 50$ transcurridos 4x10⁶ ciclos MC. Como se puede observar, para los casos 1,3 y 9 se obtuvo un depósito amiloides en donde la totalidad de los distintos monómeros de $\beta 2m$ hicieron parte de la nueva fase; para 2,4,5,6,8 se obtuvieron dos depósitos amiloides en donde el de menor

tamaño varió entre 14-21 y el de mayor tamaño varió entre 29-35. En las simulaciones 7 y 10 se obtuvieron tres depósitos amiloides y cuyos tamaños variaron entre 9-25 monómeros. Lo anterior tuvo como efecto un aumento en la desviación estándar y el promedio tanto de las abundancias de los distintos oligómeros como la distribución de monómeros presentados en las Figuras 35 y 36.

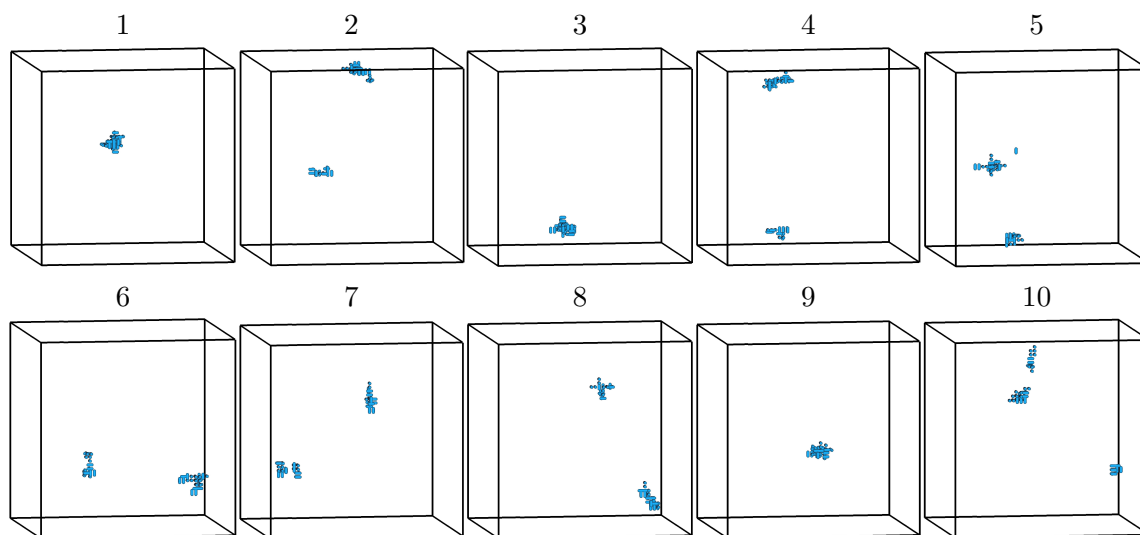


Figura 40. Imágenes tridimensionales de la evolución de diez simulaciones independientes para $N = 50$ y 310 K de temperatura.

Una de las características encontradas en estos resultados fue que a medida que aumentó la concentración, el número de depósitos de $\beta 2m$ también aumentó. En la Figura 41 se muestran las imágenes de una simulación para los diferentes valores de N a 4×10^6 ciclos MC. Para $N = 100$ se observaron entre 3 y 5 depósitos y cuyos tamaños variaron entre 8 y 53 monómeros de $\beta 2m$; donde este último únicamente se observó en una simulación (por tal razón no se reportó en las Figuras 35 y 36). El número de formación de depósitos para $N = 200$ fue entre 8 y 11 con variaciones entre 7-54 en el tamaño de los oligómeros. Para $N = 400$, el número de depósitos de $\beta 2m$ variaron entre 15 y 21 con tamaños de oligómeros entre 7 y 63. Para $N = 600$ la cantidad de depósitos fue entre 23 y 30 con variaciones de tamaño entre 7 y 65. Finalmente para $N = 800$, la cantidad de asociaciones de $\beta 2m$ varió entre 31 y 34 y cuyos tamaños variaron entre 7 y 58 monómeros.

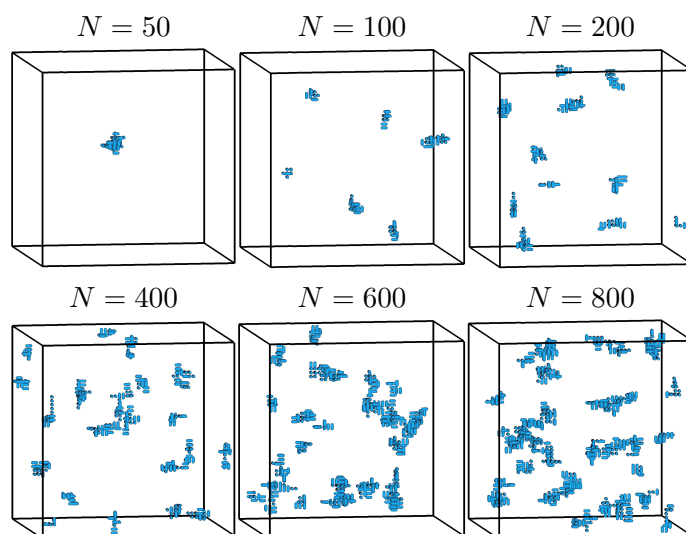


Figura 41. Imágenes tridimensionales de la formación de depósitos amiloides de $\beta 2m$ para los distintos casos de N y 310 K de temperatura.

La formación tanto de los intermediarios oligoméricos como de los depósitos amiloides de $\beta 2m$ puede ser visto como un fenómeno estocástico en donde se presentan procesos competitivos de difusión, adsorción y desorción. Como ejemplo representativo, en la Figura 42 se muestra algunos instantes de la etapa inicial que condujeron a la obtención del hexámero de una simulación donde se emplearon 600 monómeros y una temperatura de 310 K. Para fines prácticos, las esferas en color azul representan los monómeros involucrados en la obtención del hexámero.

Al cabo de los primeros 1000 ciclos MC, cuatro monómeros se encuentran en estado libre y dos monómeros forman un dímero. Seguidamente, dos monómeros forman un nuevo dímero; mientras que los restantes monómeros se difunden aleatoriamente. En la segunda imagen se muestran la agregación simultánea de dos monómeros a uno de los dímeros los cuales forman el tetrámero. Previo a este proceso, se observaron eventos de desorción-adsorción formando dos trímeros como consecuencia del intercambio de monómeros en los distintos oligómeros. Luego que el dímero y el tetrámero fueron formados, estos se asociaron formando el hexámero. Sin embargo, este patrón de asociación no fue el mismo para todas las simulaciones llevadas a cabo en este trabajo. La formación de trímeros ocurrió a través de dos vías: asociación monómero-dímero

o adición consecutiva de tres monómeros; para el caso del tetrámero ocurrió mediante asociaciones dímero-dímero, dímero-trímero, tetrámero-monómero y adición consecutiva de monómeros.

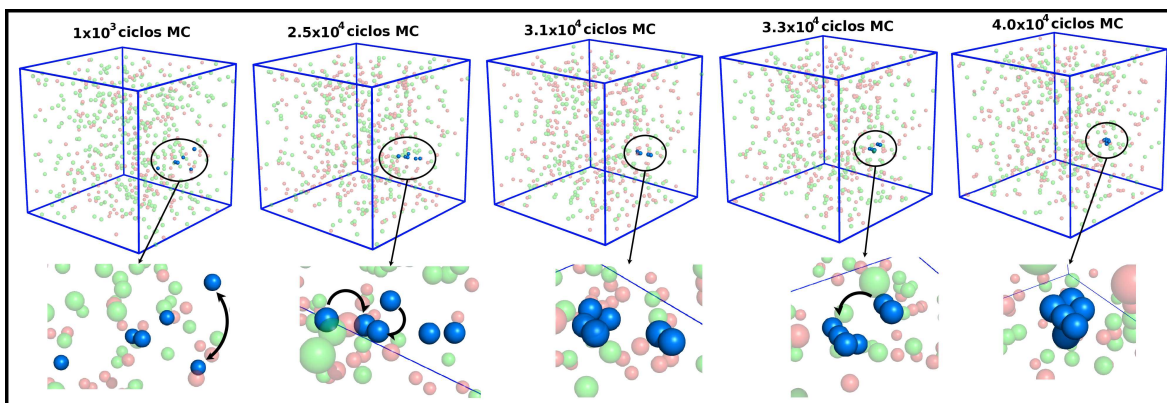


Figura 42. Imágenes tridimensionales de la evolución de la dinámica de formación de oligómeros intermedios en la etapa de iniciación para $N = 600$ y 310 K de temperatura.

Lo anterior sugiere que la formación de los oligómeros intermedios no necesariamente ocurre a través de un proceso discreto (dímeros, tetrámeros, hexámeros). Por el contrario, es un proceso mucho más complejo en donde puede ocurrir distintas vías de asociación: adición monómero-monómero, monómero-oligómero, oligómero-oligómero obteniendo una mezcla mucho más compleja de oligómeros.

En términos de la concentración y la temperatura, todas las simulaciones llevadas a cabo indicaron que todos los depósitos amiloides de $\beta 2m$ presentaron agregados de tipo amorfos revelando su independencia en función de los dos parámetros de simulación. En comparación con las evidencias experimentales, Miranker *et al.* han establecido que la etapa inicial de la fibrillogénesis de la $\beta 2m$ corresponde a la formación de dímeros, tetrámeros y hexámeros; donde este último representa el núcleo crítico [79]. Aunque en principio se creía que diferentes hexámeros se asociaban hasta alcanzar las respectivas fibras amiloide, imágenes por microscopía electrónica de transmisión revelan que la formación de los distintos oligómeros conducen a la obtención de agregados amorfos a partir de los cuales se obtienen las correspondientes fibras amiloides altamente organizadas al cabo de 7-14 días [79]. Sin embargo, este último proceso es completamente

desconocido.

De acuerdo con la evidencia experimental reportada por estos autores y los resultados obtenidos en este trabajo se observó una clara similitud en cuanto a la formación de oligómeros más sencillos (dímeros, tetrámeros, etc) y a la obtención de una serie de agregados amorfos.

Sin embargo, la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$ altamente organizadas fueron obtenidas mediante modificación de los parámetros de energía de interacción para todas las configuraciones construidas en este trabajo. En este sentido, las energías de interacción para las configuraciones 3:3, 3:5 y 5:5 se mantuvieron; mientras que para las restantes configuraciones, la energías de interacción fueron de 50 kJ/mol para garantizar que no se formaran dichas asociaciones a lo largo de cada una de las distintas simulaciones llevadas a cabo. La temperatura empleada para estas simulaciones fue de 310 K; mientras que la cantidad de monómeros fueron de 200, 400 y 600 y realizando igualmente 10 réplicas para cada caso $N - T$. En la Figura 43 se muestra las imágenes tridimensionales correspondientes a las simulaciones para los casos de $N = 200$, 400, 600 al final de cada simulación (4×10^6 ciclos MC).

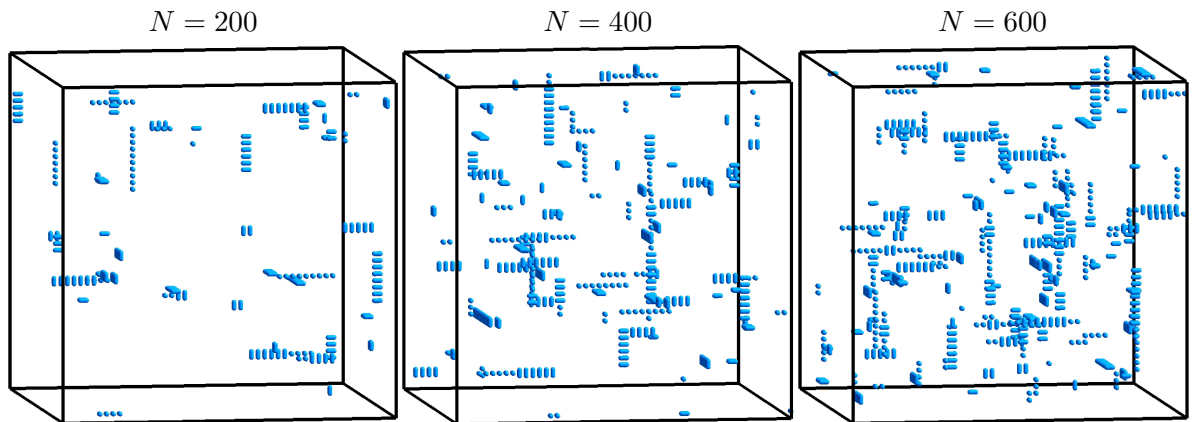


Figura 43. Imágenes tridimensionales de la formación de fibras amiloides de $\beta 2m$ para los distintos casos de N y 310 K de temperatura.

Como se puede apreciar en la Figura 43 todas las simulaciones desarrolladas mediante modificación de los valores de energía de interacción permitieron obtener depósitos

amiloides organizadas de manera lineal en las distintas direcciones de la caja. Al igual que los resultados obtenidos con los parámetros de energía calculados inicialmente, la formación de estos depósitos ocurrió a partir de la formación de intermediarios oligoméricos de cadena corta (dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros), los cuales fueron generados mediante distintas asociaciones (monómero-monómero, dímero-monómero, oligómero-monómero) a través de procesos competitivos de difusión, adsorción, desorción.

Adicionalmente se observó que a medida que aumentó la concentración, tanto la cantidad de asociaciones (ver Figura 43) como el tamaño máximo de las fibras obtenidas aumentaron en función de la concentración. Para el caso de $N = 200$ el tamaño máximo de las fibras amiloides de $\beta 2m$ varió entre 15 y 19 monómeros; para $N = 400$ fue entre 19 y 26; y para $N = 600$ fue entre 24 y 31.

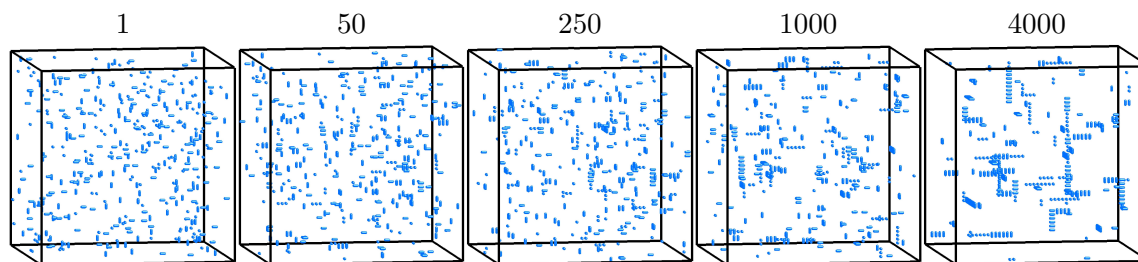


Figura 44. Imágenes tridimensionales de la evolución de las simulaciones de dinámica para distintos ciclos de simulación (ciclos $MC \times 10^3$) para $N = 400$ y 310 K de temperatura para la obtención de fibras amiloides de $\beta 2m$.

En la Figura 44 se muestran las imágenes tridimensionales de algunos instantes de una simulación para el caso de $N = 400$ y 310 K de temperatura. Como se puede observar, esta simulación parte de la distribución aleatoria de monómeros de $\beta 2m$ en las distintas direcciones de la caja. A medida que avanzó esta simulación, se da inicio a la formación de intermediarios oligoméricos lineales de cadena corta (dímeros y tetrámeros) y estos a su vez se asociaron formando finalmente las fibras amiloides de $\beta 2m$ al cabo de 4×10^6 ciclos MC y cuyas interacciones monómero-monómero son únicamente a través de las hojas I y II (3:3; 3:5 y 5:5) de cada proteína $\beta 2m$; comportamiento que fue similar para las simulaciones en donde se emplearon 200 y 600 monómeros de $\beta 2m$.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se desarrolló satisfactoriamente un modelo teórico y computacional para brindar una primera descripción aproximada de la formación de desósitos amiloides de $\beta 2m$ teniendo en cuenta las condiciones fisiológicas de pacientes con insuficiencia renal crónica y quienes presentan la formación de estos materiales proteicos.

El uso de un modelo de grano grueso permitió reducir significativamente el cálculo de la energía de interacción entre dos proteínas de $\beta 2m$ en función del modo de contacto. Esto se logró empleando cinco puntos vectoriales que representaron las distintas regiones de la proteína $\beta 2m$, a partir de los cuales se diseñaron 162 diferentes orientaciones. De todas las configuraciones obtenidas en este trabajo, se pudo observar que las de menor energía presentaron un ordenamiento antiparalelo y un contacto entre las hebras ABED-ABED de dos monómeros de $\beta 2m$ que fueron similares a las reportadas por Vachet *et al.* y Miranker *et ál.*

En virtud de la reducción de los grados de libertad para calcular la energía de interacción entre dos monómeros vecinales, se logró obtener igualmente una reducción significativa del costo computacional para el cálculo de la energía total del sistema empleando grandes cantidad de proteínas de $\beta 2m$ y facilitando realizar una exploración simplificada de la asociación de proteínas de $\beta 2m$ usando el método de Metropolis en combinación con el modelo de Ising. Como resultado, se pudo obtener diferentes sitios de agregación a lo largo del espacio de muestreo correspondiente a la formación de la fase amiloide de $\beta 2m$.

Durante la exploración del espacio configuracional asociado a la agregación de proteínas $\beta 2m$ se observó que dicho proceso es mediado por la formación inicial de oligómeros intermedios de tipo dímeros, trímeros, tetrámeros, etc a través de etapas de difusión, adsorción, desorción; los cuales generaron intercambios de monómeros de $\beta 2m$ entre la fase acuosa y la fase amiloide hasta alcanzar un intermediario cuyo tamaño permitió obtener agregados mas estables en términos de la energía total del sistema y la cantidad de monómeros involucrados en la formación de la nueva fase. Aunque experimentalmente no es observada la formación de oligómeros de tamaño impar, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que son necesarios para lograr obtener el correspondiente oligómero crítico, es decir, el hexámero.

La asociación de proteínas $\beta 2m$ se analizó como un proceso dependiente de nucleación. En este sentido se consideraron varios aspectos relacionados con el proceso tales como el tiempo de latencia y la velocidad inicial de asociación en función de la concentración y la temperatura. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron una directa dependencia de la velocidad inicial de asociación y el tiempo de latencia con las variables termodinámicas de control (concentración y temperatura); indicando que ha medida que aumentó la concentración, la velocidad inicial aumentó y el tiempo de latencia disminuyó. En términos de la temperatura, la velocidad inicial de asociación disminuyó; mientras que el tiempo de latencia aumentó. Estos resultados estuvieron en concordancia con algunos reportes de la literatura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Grey, H. M.; Kubo, R. T.; Colon, S. M.; Poulik, M. D.; Cresswell, P.; Springer, T.; Turner, M. y Strominger, J. L. “The small subunit of HL-A antigens is β 2-microglobulin”. *J. Exp. Med.* **1973**, 138, 1608–1612.
- [2] Imai, J.; Hasegawa, H.; Maruya, M.; Koyasu, S. y Yahara, I. “Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells”. *Int. Immunol.* **2005**, 17, 45–53.
- [3] Floege, J. y Ketteler, M. “ β 2-microglobulin-derived amyloidosis: An update”. *Kidney Intern.* **2001**, 59, S164–S171.
- [4] Druke, T. B. “ β 2-microglobulin and amyloidosis”. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2000**, 15, 17–24.
- [5] Gejyo, F.; Yamada, T.; Odani, S.; Nakagawa, Y.; Arakawa, M.; Kunitomo, T.; Kataoka, H.; Suzuki, M.; Hirasawa, Y.; Shirahama, T.; Cohen, A. S. y Schmid, K. “A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β 2-microglobulin”. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1985**, 129, 701–706.
- [6] Gejyo, F.; Odani, S.; Yamada, T.; Honma, N.; Saito, H.; Suzuki, Y.; Nakagawa, Y.; Kobayashi, H.; Maruyama, Y.; Hirasawa, Y.; Suzuki, M. y Arakawa, M. “ β 2-microglobulin: A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis”. *Kidney Int.* **1986**, 30, 385–390.
- [7] Esposito, G.; Michelutti, R.; Verdone, G.; Viglino, P.; Ández, H. H.; Robinson, C. V.; Amoresano, A.; Piaz, F. D.; Monti, M.; Pucci, P.; Mangione, P.; Stoppini, M.; Merlini, G.; Ferri, G. y Bellotti, V. “Removal of the N-terminal hexapeptide from human β 2-microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation”. *Protein Sci.* **2000**, 9, 831–845.
- [8] McParland, V. J.; Kad, N. M.; Kalverda, A. P.; Brown, A.; Kirwin-Jones, P.; Hunter, M. G.; Sunde, M. y Radford, S. E. “Partially unfolded states of β 2-microglobulin and amyloid formation in vitro”. *Biochemistry.* **2000**, 39, 8735–8746.
- [9] Morgan, C. J.; Gelfand, M.; Atreya, C. y Miranker, A. D. “Kidney dialysis-associated amyloidosis: a molecular role for copper in fiber formation”. *J. Mol. Biol.* **2001**, 309, 339–345.

- [10] Lim, J. y Vachet, R. W. “Using mass spectrometry to study copper-protein binding under native and non-native conditions: β -2-microglobulin”. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 3498–3504.
- [11] Kozhukh, G. V.; Hagihara, Y.; Kawakami, T.; Hasegawa, K.; Naiki, H. y Goto, Y. “Investigation of a peptide responsible for amyloid fibril formation of β 2-microglobulin by *Achromobacter* protease I”. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 1310–1315.
- [12] Ivanova, M. I.; Gingery, M.; Whitson, L. J. y Eisenberg, D. “Role of the C-Terminal 28 residues of β 2-microglobulin in amyloid fibril formation”. *Biochemistry.* **2003**, 42, 13536–13540.
- [13] Canet, D.; Sunde, M.; Last, A. M.; Miranker, A.; Spencer, A.; Robinson, C. V. y Dobson, C. M. “Mechanistic studies of the folding of human lysozyme and the origin of amyloidogenic behavior in its disease-related variants”. *Biochemistry.* **1999**, 38, 6419–6427.
- [14] Schuler, B.; Rachel, R. y Seckler, R. “Formation of fibrous aggregates from a non-native intermediate: The isolated P22 tailspike β -helix domain”. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 18589–18596.
- [15] Lansbury, P. T. “Evolution of amyloid: What normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease”. *P. Natl. Acad. Scie. USA.* **1999**, 96, 3342–3344.
- [16] Rochet, J.-C. y Lansbury, P. T. “Amyloid fibrillogenesis: themes and variations”. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 60–68.
- [17] Colon, W. y Kelly, W. Jeffery “Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro”. *Biochemistry.* **1992**, 31, 8654–8660.
- [18] Park, S. y Saven, J. G. “Simulation of pH-dependent edge strand rearrangement in human β 2-microglobulin”. *Prot. Sci.* **2006**, 15, 200–207.
- [19] Petkova, A. T.; Buntkowsky, G.; Dyda, F.; Leapman, R. D.; Yau, W. M. y Tycko, R. “Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel β -sheet registry in fibrils formed by a β -amyloid peptide”. *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 247–260.
- [20] Hoppener, J. W. M.; Nieuwenhuis, M. G.; Vroom, T. M.; Cees, B. y Lips, J. M. “Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus: consequence or cause?”. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, 197, 205–212.
- [21] Cervenakova, L.; Yakovleva, O. y McKenzie, C. “Protease-resistant prion protein in lymphoreticular tumors of variant Creutzfeldt-Jakob disease mice”. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, 12, 511–513.
- [22] Prusiner, S. B.; Scott, M. R.; DeArmond, S. J. y Cohen, F. E. “Prion protein biology”. *Cell.* **1998**, 93, 337–348.

- [23] Serpell, L. C. “Alzheimer’s amyloid fibrils: structure and assembly”. *BBA - Mol. Basis Dis.* **2000**, 1502, 16–30.
- [24] Fändrich, M. “On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates”. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 2066–2078.
- [25] Ohnishi, S. y Takano, K. “Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding”. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 511–524.
- [26] Nilsson, M. R. “Techniques to study amyloid fibril formation in vitro”. *Methods.* **2004**, 34, 151–160.
- [27] Jahn, T. R.; Makin, O. S.; Morris, K. L.; Marshall, K. E.; Tian, P.; Sikorski, P. y Serpell, L. C. “The common architecture of cross- β amyloid”. *J. Mol. Biol.* **2010**, 395, 717–727.
- [28] Smith, D. P.; Jones, S.; Serpell, L. C.; Sunde, M. y Radford, S. E. “A systematic investigation into the effect of protein destabilisation on β 2-microglobulin amyloid formation”. *J. Mol. Biol.* **2003**, 330, 943–954.
- [29] Eakin, C. M.; Knight, J. D.; Morgan, C. J.; Gelfand, M. A. y Miranker, A. D. “Formation of a copper specific binding site in non-native states of β -2-microglobulin”. *Biochemistry.* **2002**, 41, 10646–10656.
- [30] Eakin, C. M.; Berman, A. J. y Miranker, A. D. “A native to amyloidogenic transition regulated by a backbone trigger”. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, 13, 202–208.
- [31] Calabrese, M. F.; Eakin, C. M.; Wang, J. M. y Miranker, A. D. “A regulatable switch mediates self-association in an immunoglobulin fold”. *Nature.* **2008**, 15, 965–971.
- [32] Mendoza, V. L.; Antwi, K.; Barón-Rodríguez, M. A.; Blanco, C. y Vachet, R. W. “Structure of the preamyloid dimer of β -2-microglobulin from covalent labeling and mass spectrometry”. *Biochemistry.* **2010**, 49, 1522–1532.
- [33] Rock, K. L. y Goldberg, A. L. “Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides”. *Ann. Rev. Immunol.* **1999**, 17, 739–779.
- [34] Pamer, E. y Cresswell, P. “Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing”. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, 16, 323–358.
- [35] Floege, J. y Ehlerding, G. “ β -2-microglobulin-associated amyloidosis”. *Nephron.* **1996**, 72, 9–26.
- [36] Becker, J. W. y Reeke, G. N. “Three-dimensional structure of β 2-microglobulin”. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, 82, 4225–4229.
- [37] Okon, M.; Bray, P. y Vucelic, D. “Proton NMR assignments and secondary structure of human β 2-microglobulin in solution”. *Biochemistry.* **2000**, 31, 8906–8915.

- [38] Khan, A. R.; Baker, B. M.; Ghoss, P.; Biddison, W. E. y Wiley, D. C. “The estructure and stability of an HLA-A* 0201/octameric Tax peptide complex with an empty conserved peptide-N-terminal binding site”. *J. Immun.* **2000**, 164, 6398–6405.
- [39] Karlsson, F. A.; Groth, T.; Sege, K.; Wibell, L. y Peterson, P. A. “Turnover in humans of β 2-microglobulin: the constant chain of HLA-antigens”. *Eur. J. Clin. Inv.* **1980**, 10, 293–300.
- [40] Floege, J.; Bartsch, A.; Schulze, M.; Shaldon, S.; Koch, K. y Smeby, L. “Clearance and synthesis rates of beta 2-microglobulin in patients undergoing hemodialysis and in normal subjects”. *J. Lab. Clin. Med.* **1991**, 118, 153–165.
- [41] Homma, N.; Gejyo, F.; Isemura, M. y Arakawa, M. “Collagen-binding afinity of β -2-microglobulin, a preprotein of hemodialysis-associated amyloidosis”. *Nephron.* **1989**, 53, 37–40.
- [42] Gorevic, P. D.; Munoz, P. C.; Casey, T. T.; DiRaimondo, C. R.; Stone, W. J.; Prelli, F. C.; Rodrigues, M. M.; Poulik, M. D. y Frangione, B. “Polymerization of intact β 2-microglobulin in tissue causes amyloidosis in patients on chronic hemodialysis”. *P. Natl Acad. Sci. USA.* **1986**, 83, 7908–7912.
- [43] Sritippayawan, S.; Chiangjong, W.; Semangoen, T.; Aiyasanon, N.; Jaetanawanitch, P.; Sinchaikul, S.; Chen, S.-T.; Vasuvattakul, S. y Thongboonkerd, V. “Proteomic analysis of peritoneal dialysate fluid in patients with different types of peritoneal membranes”. *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 4356–4362.
- [44] Chychul, L. M.; Basu, T. K. y Dasgupta, M. K. “Continuous ambulatory peritoneal dialysis and micronutrients: A review”. *Nutr. Res.* **1991**, 11, 513–525.
- [45] Hébert, M.-J.; Falardeau, M.; Pichette, V.; Houde, M.; Nolin, L.; Cardinal, J. y Ouimet, D. “Continuous ambulatory peritoneal dialysis for patients with severe left ventricular systolic dysfunction and end-stage renal disease,”. *Am. J. Kidney Dis.* **1995**, 25, 761–768.
- [46] Breckenridge, W. C.; Roncari, D. A. K.; Khanna, R. y Oreopoulos, D. G. “The influence of continuous ambulatory peritoneal dialysis on plasma lipoproteins”. *Atherosclerosis.* **1982**, 45, 249–258.
- [47] Ching, C. S.; Pun, O.-M.; Wong, K.-S. y Chan, C. L. “Quality of life of continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients”. *Hong Kong J. Nephrol.* **2000**, 2, 98–103.
- [48] Pellicano, R.; Polkinghorne, K. R. y Kerr, P. G. “Reduction in β 2-microglobulin with super-flux versus high-flux dialysis membranes: Results of a 6-week, randomized, double-blind, crossover trial”. *Am. J. Kidney Dis.* **2008**, 52, 93–101.

- [49] Kerr, P. G.; Sutherland, W. H.; Jong, S.d; Vaithalingham, I.; Williams, S. M. y Walker, R. J. “The impact of standard high-flux polysulfone versus novel high-flux polysulfone dialysis membranes on inflammatory markers: A randomized, single-blinded, controlled clinical trial”. *Am. J. Kidney Dis.* **2007**, 49, 533–539.
- [50] Zweigart, C.; Neubauer, M.; Storr, M.; Böhler, T. y Krause, B., *Progress in the Development of Membranes for Kidney-Replacement Therapy*, in *Comprehensive Membrane Science and Engineering*, ed. Drioli, E. y Giorno, L., Elsevier, Oxford, 2010, pp. 351–390.
- [51] Lornoy, W.; Becaus, I.; Billiouw, J. M.; Sierens, L.; Van Malderen, P. y D’Haenens, P. “On-line haemodiafiltration. remarkable removal of β 2-microglobulin. long-term clinical observations”. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2000**, 15, 49–54.
- [52] Vilar, E.; Fry, A. C.; Wellsted, D.; Tattersall, J. E.; Greenwood, R. N. y Farrington, K. “Long-term outcomes in online hemodiafiltration and high-flux hemodialysis: A comparative analysis”. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, 4, 1944–1953.
- [53] Meert, N.; Eloot, S.; Waterloos, M.-A.; Van Landschoot, M.; Dhondt, A.; Glorieux, G.; Ledebos, I. y Vanholder, R. “Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial”. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, 24, 562–570.
- [54] Sipe, J. D. “Amyloidosis”. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, 61, 947–975.
- [55] Yamada, T.; Kakihara, T.; Gejyo, F. y Okada, M. “A monoclonal antibody recognizing apolipoprotein E peptides in systemic amyloid deposits”. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1994**, 24, 243–249.
- [56] Argilés, A. “ β 2-microglobulin amyloidosis”. *Nephrology.* **1996**, 2, 373–386.
- [57] Pepys, M. B. “Amyloidosis”. *Annu. Rev. Med.* **2006**, 57, 223–241.
- [58] Nilsson, M. R. “Techniques to study amyloid fibril formation in vitro”. *Methods.* **2004**, 34, 151–160.
- [59] Gosal, W. S.; Myers, S. L.; Radford, S. E. y Thomson, N. H. “Amyloid under the atomic force microscope”. *Protein Peptide Lett.* **2006**, 13, 261–270.
- [60] Smith, A. M.; Jahn, T. R.; Ashcroft, A. E. y Radford, S. E. “Direct observation of oligomeric species formed in the early stages of amyloid fibril formation using electrospray ionisation mass spectrometry”. *J. Mol. Biol.* **2006**, 364, 9–19.
- [61] Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J. W.; McFarlane, H. T.; Madsen, A. O.; Riek, C. y Eisenberg, D. “Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers”. *Nature.* **2007**, 447, 453–457.

- [62] Kad, N. M.; Myers, S. L.; Smith, D. P.; Smith, D. A.; Radford, S. E. y Thomson, N. H. “Hierarchical assembly of β 2-microglobulin amyloid in vitro revealed by atomic force microscopy”. *J. Mol. Biol.* **2003**, 330, 785–797.
- [63] White, H. E.; Hodgkinson, J. L.; Jahn, T. R.; Cohen-Krausz, S.; Gosal, W. S.; Müller, S.; Orlova, E. V.; Radford, S. E. y Saibil, H. R. “Globular tetramers of β 2-microglobulin assemble into elaborate amyloid fibrils”. *J. Mol. Biol.* **2009**, 389, 48–57.
- [64] Sunde, M.; Serpell, L. C.; Bartlam, M.; Fraser, P. E.; Pepys, M. B. y Blake, C. C. F. “Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction”. *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 729–739.
- [65] Sunde, M. y Blake, C. “The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction”. *Advan. Protein Chem.* **1997**, 50, 123–159.
- [66] Makin, O. S.; Atkins, E.; Sikorski, P.; Johansson, J. y Serpell, L. C. “Molecular basis for amyloid fibril formation and stability”. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, 102, 315–320.
- [67] Gosal, W. S.; Morten, I. J.; Hewitt, E. W.; Smith, D. A.; Thomson, N. H. y Radford, S. E. “Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of β 2-microglobulin into amyloid”. *J. Mol. Biol.* **2005**, 351, 850–864.
- [68] Hiramatsu, H.; Lu, M.; Matsuo, K.; Gekko, K.; Goto, Y. y Kitagawa, T. “Differences in the molecular structure of β 2-microglobulin between two morphologically different amyloid fibrils”. *Biochemistry.* **2010**, 49, 742–751.
- [69] Jones, S.; Smith, D. P. y Radford, S. E. “Role of the N and C-terminal strands of β 2-microglobulin in amyloid formation at neutral pH”. *J. Mol. Biol.* **2003**, 330, 935–941.
- [70] Platt, G. W.; Routledge, K. E.; Homans, S. W. y Radford, S. E. “Fibril growth kinetics reveal a region of β 2-microglobulin important for nucleation and elongation of aggregation”. *J. Mol. Biol.* **2008**, 378, 251–263.
- [71] Sasahara, K.; Yagi, H.; Sakai, M.; Naiki, H. y Goto, Y. “Amyloid nucleation triggered by agitation of β 2-microglobulin under acidic and neutral pH conditions”. *Biochemistry.* **2008**, 47, 2650–2660.
- [72] McParland, V. J.; Kalverda, A. P.; Homans, S. W. y Radford, S. E. “Structural properties of an amyloid precursor of β 2-microglobulin”. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 326–331.
- [73] Ivanova, M. I.; Sawaya, M. R.; Gingery, M.; Attinger, A. y Eisenberg, D. “An amyloid-forming segment of an amyloid-forming segment of β 2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **2004**, 101, 10584–10589.

- [74] Jones, S.; Manning, J.; Kad, N. M. y Radford, S. E. “Amyloid-forming peptides from β 2-microglobulin-insights into the mechanism of fibril formation *in vitro*”. *J. Mol. Biol.* **2003**, 325, 249–257.
- [75] Mar, G.-G.; Ángel, A.; Annie, G.-C.; Mercé, D.; José, G.-V. y Georges, M. “Impaired lysosomal processing of β 2-microglobulin by infiltrating macrophages in dialysis amyloidosis”. *Kidney Int.* **1999**, 55, 899–906.
- [76] Malaguarnera, M.; Restuccia, S.; Fazio, I. D.; Zoccolo, A. M.; Trovato, B. A. y Pistone, G. “Serum β 2-microglobulin in chronic hepatitis C”. *Dig. Dis. Sci.* **1997**, 42, 762–766.
- [77] Annalisa, R.; Claudio, C.; Silvia, D. S.; Ranieri, R.; Sofia, G.; Monica, S.; Antonio, R.; Federico, F.; Alessandra, C.; Gennaro, E.; Alessandra, G. y Vittorio, B. “Collagen plays an active role in the aggregation of β 2-microglobulin under physiopathological conditions of dialysis-related amyloidosis”. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 16521–16529.
- [78] Yumiko, O.; Miho, K.; Hironobu, N. y Yuji, G. “Ultrasonication-induced amyloid fibril formation of β 2-microglobulin”. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 32843–32848.
- [79] Eakin, C. M.; Attenello, F. J.; Morgan, C. J. y Miranker, A. D. “Oligomeric assembly of native-like precursors precedes amyloid formation by β -2 microglobulin”. *Biochemistry.* **2004**, 43, 7808–7815.
- [80] Antwi, K.; Mahar, M.; Srikanth, R.; Olbris, M. R.; Tyson, J. F. y Vachet, R. W. “Cu(II) organizes β 2m-2-microglobulin oligomers but is released upon amyloid formation”. *Prot. Sci.* **2008**, 17, 748–759.
- [81] Kameda, A.; Hoshino, M.; Higurashi, T.; Takahashi, S.; Naiki, H. y Goto, Y. “Nuclear magnetic resonance characterization of the refolding intermediate of β 2-microglobulin trapped by nonnative prolyl peptide bond”. *J. Mol. Biol.* **2005**, 348, 383–397.
- [82] Benyamini, H.; Gunasekaran, K.; Wolfson, H. y Nussinov, R. “ β 2-microglobulin amyloidosis: Insights from conservation analysis and fibril modelling by protein docking techniques”. *J. Mol. Biol.* **2003**, 330, 159–174.
- [83] Benyamini, H.; Gunesekaran, K.; Wolfson, H. y Nussinov, R. “Fibril modelling by sequence and structure conservation analysis combined with protein docking techniques: β 2-microglobulin amyloidosis”. *BBA-Proteins Proteom.* **2005**, 1753, 121–130.
- [84] Deng, N.; Yan, L.; Singh, D.; y Cieplak., P. “Molecular basis for the Cu^{2+} binding induced destabilization of β 2-microglobulin revealed by molecular dynamics simulation.”. *Bioph. J.* **2006**, 90, 3865–3879.

- [85] Armen, R. S. y Daggett, V. “Characterization of two distinct β 2-microglobulin unfolding intermediates that may lead to amyloid fibrils of different morphology”. *Biochemistry*. **2005**, 44, 16098–16107.
- [86] García-Ruiz, J. M. “Nucleation of protein crystals”. *J. Struct. Biol.* **2003**, 142, 22–31.
- [87] Leach, A., *Molecular Modelling: Principles and Applications (2nd Edition)*, Prentice Hall, 2 edn., 2001.
- [88] Duan, Y.; Wu, H.; Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J. y Kollman, P. “A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations”. *J. Comput. Chem.* **2003**, 24, 1999–2012.
- [89] MacKerel Jr., A.; Brooks III, C.; Nilsson, L.; Roux, B.; Won, Y. y Karplus, M., John Wiley & Sons: Chichester, 1998, vol. 1 of *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, pp. 271–277.
- [90] Malolepsza, E.; Boniecki, M.; Kolinski, A. y Piela, L. “Theoretical model of prion propagation: A misfolded protein induces misfolding”. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. **2005**, 102, 7835–7840.
- [91] Pellarin, R. y Caffisch, A. “Interpreting the aggregation kinetics of amyloid peptides”. *J. Mol. Biol.* **2006**, 360, 882–892.
- [92] J., M. S.; Jelger, R. H.; Serge, Y.; Peter, T. D. y Vries Alex H.,d “The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations”. *Am. Chem. Soc.* **2007**, 111, 7812–7824.
- [93] Pellarin, R.; Guarnera, E. y Caffisch, A. “Pathways and intermediates of amyloid fibril formation”. *J. Mol. Biol.* **2007**, 374, 917–924.
- [94] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W. y Klein, M. L. “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water”. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926–935.
- [95] Hess, B.; Kutzner, C.; Spoel, D.vd y Lindahl, E. “Gromacs 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation”. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, 4, 435–447.
- [96] Spoel, D.vd; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E. y Berendsen, H. J. C. “Gromacs: Fast, flexible and free”. *J. Comp. Chem.* **2005**, 26, 1701–1719.
- [97] Heermann, D. W.; Coniglio, A.; Klein, W. y Stauffer, D. “Nucleation and metastability in three-dimensional Ising models”. *J. Stat. Phys.* **1984**, 36, 447–470.

- [98] Wetzel, S. K.; Settanni, G.; Kenig, M.; Binz, H. K. y Pluckthun, A. “Folding and unfolding mechanism of highly stable full-consensus ankyrin repeat proteins”. *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 241–257.
- [99] Zhang, J. y Muthukumar, M. “Simulations of nucleation and elongation of amyloid fibrils”. *J. Chem. Phys.* **2009**, 130, 035102.
- [100] Villanueva, J.; Hoshino, M.; Katou, H.; Kardos, J.; Hasegawa, K.; Naiki, H. y Goto, Y. “Increase in the conformational flexibility of β 2-microglobulin upon copper binding: A possible role for copper in dialysis-related amyloidosis”. *Protein Sci.* **2004**, 13, 797–809.
- [101] Xue, W.-F.; Homans, S. W. y Radford, S. E. “Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **2008**, 105, 8926–8931.
- [102] Harper, J. D.; Wong, S. S.; Lieber, C. M. y Peter T. Lansbury, J. “Assembly of $\alpha\beta$ amyloid protofibrils: An in vitro model for a possible early event in alzheimer’s disease”. *Biochemistry.* **1999**, 38, 8972–8980.
- [103] Zhu, L.; Zhang, X.-J.; Wang, L.-Y.; Zhou, J.-M. y Perrett, S. “Relationship between stability of folding intermediates and amyloid formation for the yeast prion Ure2p: A quantitative analysis of the effects of ph and buffer system”. *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 235–254.
- [104] Arora, A.; Ha, C. y Park, C. B. “Insulin amyloid fibrillation at above 100°C: New insights into protein folding under extreme temperatures”. *Prot. Sci.* **2004**, 13, 2429–2436.
- [105] Eichner, T. y Radford, S. E. “A generic mechanism of β 2-microglobulin amyloid assembly at neutral pH involving a specific proline switch”. *J. Mol. Biol.* **2009**, 386, 1312–1326.
- [106] Nguyen, H. D. y Hall, C. K. “Kinetics of fibril formation by polyalanine peptides”. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 9074–9082.
- [107] Griffith, J. S. “Nature of the scrapie agent: Self-replication and scrapie”. *Nature.* **1967**, 215, 1043.
- [108] Uratani, Y.; Asakura, S. y Imahori, K. “Circular dichroism study of salmonella flagellin: evidence for conformational change on polymerization”. *J. Mol. Biol.* **1972**, 67, 85–98.
- [109] Prusiner, S. B. “Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie”. *Science.* **1982**, 216, 136.
- [110] Joseph, T. J. y Lansbury, P. T. “Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: A pathogenic mechanism in alzheimer’s disease and scrapie?”. *Cell.* **2004**, 73, 1055.

- [111] Serio, T. R.; Cashikar, A. G.; Kowal, A. S.; Sawicki, G. J.; Moslehi, J. J.; Serpell, L. y Lindquist, M. F. A. S. L. “Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant”. *Science*. **2000**, 289, 1317–1321.
- [112] Harper, J. D. y Lansbury, P. T. “Models of amyloid seeding in alzheimer’s disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins”. *Annual Review of Biochemistry*. **1997**, 66, 385–407.
- [113] Kelly, J. W. “Mechanisms of amyloidogenesis”. *Nat Struct Mol Biol*. **2000**, 7, 824–826.
- [114] Lomakin, A.; Chung, D. S.; Benedek, G. B.; Kirschner, D. A. y Teplow, D. B. “On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **1996**, 93, 1125–1129.
- [115] Corazza, A.; Pettirossi, F.; Viglino, P.; Verdone, G.; Garcia, J.; Dumy, P.; Giorgetti, S.; Mangione, P.; Raimondi, S.; Stoppini, M.; Bellotti, V.; y Esposito, G. “Properties of some variants of human β 2-microglobulin and amyloidogenesis”. *J. Biol. Chem*. **2004**, 279, 9176–9189.
- [116] Carulla, N.; Zhou, M.; Arimon, M.; Gairí, M.; Giralt, E.; Robinson, C. V. y Dobson, C. M. “Experimental characterization of disordered and ordered aggregates populated during the process of amyloid fibril formation”. *Proc. Natl Acad. Sci*. **2008**, 106, 7828–7833.
- [117] Bader, R.; Bamford, R.; Zurdo, J.; Luisi, B. F. y Dobson, C. M. “Probing the mechanism of amyloidogenesis through a tandem repeat of the PI3-SH3 domain suggests a generic model for protein aggregation and fibril formation”. *J. Mol. Biol*. **2006**, 356, 189 – 208.
- [118] Petty, S. A. y Decatur, S. M. “Experimental evidence for the reorganization of β -strands within aggregates of the $\alpha\beta$ (16-22) peptide”. *J. Am. Chem. Soc*. **2005**, 127, 13488–13489.

ANEXOS


```

89      NPOSIC = NMLIST(I)
90      IF (CCONT.EQ.0.AND.NPOSIC.NE.MON) THEN
91          CCONT = CCONT + 1
92          TCOORD(CCONT,1) = NPOSIC
93          TCOORD(CCONT,2) = NET(NPOSIC,1)
94          TCOORD(CCONT,3) = NET(NPOSIC,2)
95          TCOORD(CCONT,4) = NET(NPOSIC,3)
96      END IF
97      IF (CCONT.GT.0.AND.NPOSIC.NE.MON) THEN
98          NCOMN = 0
99          DO J = 1, CCONT
100             IF (NPOSIC.EQ.TCOORD(J,1)) THEN
101                 GO TO 135
102             END IF
103             IF (NPOSIC.NE.TCOORD(J,1)) THEN
104                 NCOMN = 1
105             END IF
106         END DO
107         IF (NCOMN.EQ.1) THEN
108             CCONT = CCONT + 1
109             TCOORD(CCONT,1) = NPOSIC
110             TCOORD(CCONT,2) = NET(NMLIST(I),1)
111             TCOORD(CCONT,3) = NET(NMLIST(I),2)
112             TCOORD(CCONT,4) = NET(NMLIST(I),3)
113         END IF
114     END IF
115 135 CONTINUE
116     END IF
117     DO J = 1, NARRAY
118         IF (MON.EQ.ARRAY(J,1)) THEN
119             POS = J
120             POSI = POS
121             POSF = POSI + 4
122             DO N = POSI, POSF
123                 TLABEL(N,1) = ARR(LABEL(N,1))
124                 TLABEL(N,2) = ARR(LABEL(N,2))
125                 TMARRA(N,2) = ARRAY(N,2)
126                 TMARRA(N,3) = ARRAY(N,3)
127                 TMARRA(N,4) = ARRAY(N,4)
128             END DO
129             GOTO 40
130         END IF
131     END DO
132 40 COINC = RANFC()
133
134     IF (COINC.LE.0.330D0) THEN
135         OFFX = 0
136         OFFY = 0
137         OFFZ = 0
138 C *****
139 C ** CAMBIA LA ORIENTACION DEL MONOMERO SELECCIO- ** C
140 C ** NADO (PUNTOS VECTORIALES). ** C
141 C *****
142         DO J = 1, 5
143 C *****
144 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 1 ** C
145 C ** SIEMPRE ESTA UBICADO EN EL ORIGEN [0,0,0] ** C
146 C *****
147             IF (J.EQ.1) THEN
148                 ARRAY(POS,2) = 0
149                 ARRAY(POS,3) = 0
150                 ARRAY(POS,4) = 0
151             END IF
152 C *****
153 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 2 ** C
154 C *****
155             IF (J.EQ.2) THEN
156                 POS = POS + 1
157                 COIN = RANFA()
158                 IF (COIN.LE.0.3333) THEN
159 C *****
160 C ** EJE X ** C
161 C *****
162                 COINB = RANFB()
163                 OFFX = 1
164                 IF (COINB.LE.0.5) THEN
165                     ARRAY(POS,2) = -1
166                     ARRAY(POS,3) = 0
167                     ARRAY(POS,4) = 0
168                 END IF
169                 IF (COINB.GT.0.5) THEN
170                     ARRAY(POS,2) = 1
171                     ARRAY(POS,3) = 0
172                     ARRAY(POS,4) = 0
173                 END IF
174             END IF
175             IF (COIN.GT.0.3333.AND.COIN.LE.0.6666) THEN
176 C *****
177 C ** EJE Y ** C
178 C *****
179                 COINB = RANFB()
180                 OFFY = 1
181             IF (COINB.LE.0.5) THEN
182                 ARRAY(POS,2) = 0
183                 ARRAY(POS,3) = -1
184                 ARRAY(POS,4) = 0
185             END IF
186             IF (COINB.GT.0.5) THEN
187                 ARRAY(POS,2) = 0
188                 ARRAY(POS,3) = 1
189                 ARRAY(POS,4) = 0
190             END IF
191         END IF
192         IF (COIN.GT.0.6666) THEN
193 C *****
194 C ** EJE Z ** C
195 C *****
196             COINB = RANFB()
197             OFFZ = 1
198             IF (COINB.LE.0.5) THEN
199                 ARRAY(POS,2) = 0
200                 ARRAY(POS,3) = 0
201                 ARRAY(POS,4) = -1
202             END IF
203             IF (COINB.GT.0.5) THEN
204                 ARRAY(POS,2) = 0
205                 ARRAY(POS,3) = 0
206                 ARRAY(POS,4) = 1
207             END IF
208         END IF
209     END IF
210 C *****
211 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 3 ** C
212 C *****
213         IF (J.EQ.3) THEN
214             POS = POS + 1
215 C *****
216 C ** DETERMINAR CUALES EJES PUEDE TOMAR LA PARTI- ** C
217 C ** CULA 3. USAMOS LAS VARIABLES OFFX, OFFY, OFFZ** C
218 C *****
219             IF (OFFX.EQ.0.AND.OFFY.EQ.0.AND.OFFZ.EQ.1) THEN
220                 COIN = RANFA()
221                 IF (COIN.LT.0.5) THEN
222 C *****
223 C ** EJE X ** C
224 C *****
225                 COINB = RANFB()
226                 IF (COINB.LE.0.5) THEN
227                     ARRAY(POS,2) = -1
228                     ARRAY(POS,3) = 0
229                     ARRAY(POS,4) = 0
230                 END IF
231                 IF (COINB.GT.0.5) THEN
232                     ARRAY(POS,2) = 1
233                     ARRAY(POS,3) = 0
234                     ARRAY(POS,4) = 0
235                 END IF
236             END IF
237             IF (COIN.GE.0.5) THEN
238 C *****
239 C ** EJE Y ** C
240 C *****
241                 COINB = RANFB()
242                 IF (COINB.LE.0.5) THEN
243                     ARRAY(POS,2) = 0
244                     ARRAY(POS,3) = -1
245                     ARRAY(POS,4) = 0
246                 END IF
247                 IF (COINB.GT.0.5) THEN
248                     ARRAY(POS,2) = 0
249                     ARRAY(POS,3) = 1
250                     ARRAY(POS,4) = 0
251                 END IF
252             END IF
253         END IF
254         IF (OFFX.EQ.0.AND.OFFY.EQ.1.AND.OFFZ.EQ.0) THEN
255             COIN = RANFA()
256             IF (COIN.LT.0.5) THEN
257 C *****
258 C ** EJE X ** C
259 C *****
260                 COINB = RANFB()
261                 IF (COINB.LE.0.5) THEN
262                     ARRAY(POS,2) = -1
263                     ARRAY(POS,3) = 0
264                     ARRAY(POS,4) = 0
265                 END IF
266                 IF (COINB.GT.0.5) THEN
267                     ARRAY(POS,2) = 1
268                     ARRAY(POS,3) = 0
269                     ARRAY(POS,4) = 0
270                 END IF
271             END IF
272         IF (COIN.GE.0.5) THEN

```

```

273 C ***** C
274 C ** EJE Z ** C
275 C ***** C
276 COINB = RANFB()
277 IF (COINB.LE.0.5) THEN
278 ARRAY(POS,2) = 0
279 ARRAY(POS,3) = 0
280 ARRAY(POS,4) = -1
281 END IF
282 IF (COINB.GT.0.5) THEN
283 ARRAY(POS,2) = 0
284 ARRAY(POS,3) = 0
285 ARRAY(POS,4) = 1
286 END IF
287 END IF
288 END IF
289 IF (OFFX.EQ.1.AND.OFFY.EQ.0.AND.OFFZ.EQ.0) THEN
290 COIN = RANFA()
291 IF (COIN.LT.0.5) THEN
292 C ***** C
293 C ** EJE Y ** C
294 C ***** C
295 COINB = RANFB()
296 IF (COINB.LE.0.5) THEN
297 ARRAY(POS,2) = 0
298 ARRAY(POS,3) = -1
299 ARRAY(POS,4) = 0
300 END IF
301 IF (COINB.GT.0.5) THEN
302 ARRAY(POS,2) = 0
303 ARRAY(POS,3) = 1
304 ARRAY(POS,4) = 0
305 END IF
306 END IF
307 IF (COIN.GE.0.5) THEN
308 C ***** C
309 C ** EJE Z ** C
310 C ***** C
311 COINB = RANFB()
312 IF (COINB.LE.0.5) THEN
313 ARRAY(POS,2) = 0
314 ARRAY(POS,3) = 0
315 ARRAY(POS,4) = -1
316 END IF
317 IF (COINB.GT.0.5) THEN
318 ARRAY(POS,2) = 0
319 ARRAY(POS,3) = 0
320 ARRAY(POS,4) = 1
321 END IF
322 END IF
323 END IF
324 END IF
325 C ***** C
326 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 4 ** C
327 C ***** C
328 IF (J.EQ.4) THEN
329 POS = POS + 1
330 ARRAY(POS,2) = -1 * ARRAY(POS - 2 ,2)
331 ARRAY(POS,3) = -1 * ARRAY(POS - 2 ,3)
332 ARRAY(POS,4) = -1 * ARRAY(POS - 2 ,4)
333 END IF
334 C ***** C
335 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 5 ** C
336 C ***** C
337 IF (J.EQ.5) THEN
338 POS = POS + 1
339 ARRAY(POS,2) = -1 * ARRAY(POS - 2 ,2)
340 ARRAY(POS,3) = -1 * ARRAY(POS - 2 ,3)
341 ARRAY(POS,4) = -1 * ARRAY(POS - 2 ,4)
342 END IF
343 END DO
344 END IF
345 IF (COINC.GT.0.333DO.AND.COINC.LE.0.66DO) THEN
346 C ***** C
347 C ** DESPLAZA UN MONOMERO EN CUALQUIER DE LOS EJES** C
348 C ***** C
349 COIN = RANFB()
350 IF (COIN.LT.0.333DO) THEN
351 COINB = RANFD()
352
353 IF (COINB.LE.0.5DO) THEN
354 NET(MON,1) = NET(MON,1) - 1
355 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
356 DO I = 1, CCONT
357 NET(TCOORD(I,1),1) = NET(TCOORD(I,1),1) - 1
358 END DO
359 END IF
360 END IF
361
362 IF (COINB.GT.0.5DO) THEN
363 NET(MON,1) = NET(MON,1) + 1
364 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
365 DO I = 1, CCONT
366 NET(TCOORD(I,1),1) = NET(TCOORD(I,1),1) + 1
367 END DO
368 END IF
369 END IF
370 END IF
371
372 IF (COIN.GT.0.333DO.AND.COIN.LE.0.666DO) THEN
373 COINB = RANFD()
374
375 IF (COINB.LE.0.5DO) THEN
376 NET(MON,2) = NET(MON,2) - 1
377 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
378 DO I = 1, CCONT
379 NET(TCOORD(I,1),2) = NET(TCOORD(I,1),2) - 1
380 END DO
381 END IF
382 END IF
383
384 IF (COINB.GT.0.5DO) THEN
385 NET(MON,2) = NET(MON,2) + 1
386 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
387 DO I = 1, CCONT
388 NET(TCOORD(I,1),2) = NET(TCOORD(I,1),2) + 1
389 END DO
390 END IF
391 END IF
392 END IF
393 C ***** C
394 C ** APLICAR TRASLACION SOBRE EL EJE Z ** C
395 C ***** C
396 IF (COIN.GE.0.666DO) THEN
397 COINB = RANFD()
398
399 IF (COINB.LE.0.5DO) THEN
400 NET(MON,3) = NET(MON,3) - 1
401 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
402 DO I = 1, CCONT
403 NET(TCOORD(I,1),3) = NET(TCOORD(I,1),3) - 1
404 END DO
405 END IF
406 END IF
407
408 IF (COINB.GT.0.5DO) THEN
409 NET(MON,3) = NET(MON,3) + 1
410 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
411 DO I = 1, CCONT
412 NET(TCOORD(I,1),3) = NET(TCOORD(I,1),3) + 1
413 END DO
414 END IF
415 END IF
416 END IF
417
418
419
420 C CAMBIAR EL TIPO DE MONOMERO
421 C CASO 1. COMPLEX --> FREE
422 C CASO 2. FREE --> COMPLEX
423
424 IF (COINC.GT.0.66DO) THEN
425 C APLICANDO CASO 1.
426 IF (LABEL(MON).EQ.'CB2M') THEN
427 LABEL(MON) = 'FB2M'
428 DO J = 1, 5
429 IF (J.EQ.1) THEN
430 ARRALABEL(POS,1) = 'FB2M'
431 ARRALABEL(POS,2) = 'F1'
432 END IF
433 IF (J.EQ.2) THEN
434 POS = POS + 1
435 ARRALABEL(POS,1) = 'FB2M'
436 ARRALABEL(POS,2) = 'F2'
437 END IF
438 IF (J.EQ.3) THEN
439 POS = POS + 1
440 ARRALABEL(POS,1) = 'FB2M'
441 ARRALABEL(POS,2) = 'F3'
442 END IF
443 IF (J.EQ.4) THEN
444 POS = POS + 1
445 ARRALABEL(POS,1) = 'FB2M'
446 ARRALABEL(POS,2) = 'F4'
447 END IF
448 IF (J.EQ.5) THEN
449 POS = POS + 1
450 ARRALABEL(POS,1) = 'FB2M'
451 ARRALABEL(POS,2) = 'F5'
452 END IF
453 END DO
454 GOTO 80
455 END IF
456

```

```

457 IF (LABEL(MON).EQ.'FB2M') THEN
458 LABEL(MON) = 'CB2M'
459 DO J = 1, 5
460 IF (J.EQ.1) THEN
461 ARRALABEL(POS,1) = 'CB2M'
462 ARRALABEL(POS,2) = 'C1'
463 END IF
464 IF (J.EQ.2) THEN
465 POS = POS + 1
466 ARRALABEL(POS,1) = 'CB2M'
467 ARRALABEL(POS,2) = 'C2'
468 END IF
469 IF (J.EQ.3) THEN
470 POS = POS + 1
471 ARRALABEL(POS,1) = 'CB2M'
472 ARRALABEL(POS,2) = 'C3'
473 END IF
474 IF (J.EQ.4) THEN
475 POS = POS + 1
476 ARRALABEL(POS,1) = 'CB2M'
477 ARRALABEL(POS,2) = 'C4'
478 END IF
479 IF (J.EQ.5) THEN
480 POS = POS + 1
481 ARRALABEL(POS,1) = 'CB2M'
482 ARRALABEL(POS,2) = 'C5'
483 END IF
484 END DO
485 END IF
486
487 END IF
488 C ***** C
489 C ** LUEGO SE APLICAN CONDICIONES PERIODICAS DE ** C
490 C ** CONTORNO PARA GARANTIZAR LA CONSERVACION DEL ** C
491 C ** NUMERO DE PARTICULAS EN LA RED TRIDIMENSIONAL** C
492 C ***** C
493
494 80 DO I = 1, NPAR
495 IF (NET(I,1).GT.BOX) THEN
496 NET(I,1) = NET(I,1) - BOX
497 END IF
498 IF (NET(I,1).LT.0) THEN
499 NET(I,1) = BOX + NET(I,1)
500 END IF
501 IF (NET(I,2).GT.BOX) THEN
502 NET(I,2) = NET(I,2) - BOX
503 END IF
504 IF (NET(I,2).LT.0) THEN
505 NET(I,2) = BOX + NET(I,2)
506 END IF
507 IF (NET(I,3).GT.BOX) THEN
508 NET(I,3) = NET(I,3) - BOX
509 END IF
510 IF (NET(I,3).LT.0) THEN
511 NET(I,3) = BOX + NET(I,3)
512 END IF
513 END DO
514
515 C ***** C
516 C ** GARANTIZAR QUE DOS MONOMEROS NO SE ESTEN EN ** C
517 C ** EL MISMO PUNTO RETICULAR. ** C
518 C ***** C
519 DO J = 1, NPAR
520 IF (J.NE.MON) THEN
521 IF (NET(MON,1).EQ.NET(J,1)
522 : .AND.NET(MON,2).EQ.NET(J,2)
523 : .AND.NET(MON,3).EQ.NET(J,3)) THEN
524 NET(MON,1) = XOLD
525 NET(MON,2) = YOLD
526 NET(MON,3) = ZOLD
527 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
528 DO L = 1, CCONT
529 NET(TCOORD(L,1),1) = TCOORD(L,2)
530 NET(TCOORD(L,1),2) = TCOORD(L,3)
531 NET(TCOORD(L,1),3) = TCOORD(L,4)
532 END DO
533 GO TO 120
534 END IF
535 END IF
536 END IF
537 END DO
538 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
539 DO I = 1, CCONT
540 DO J = I, NPAR
541 IF (TCOORD(I,1).NE.J) THEN
542 IF (NET(TCOORD(I,1),1).EQ.NET(J,1).AND.
543 : NET(TCOORD(I,1),2).EQ.NET(J,2).AND.
544 : NET(TCOORD(I,1),3).EQ.NET(J,3)) THEN
545 DO L = 1, CCONT
546 NET(TCOORD(L,1),1) = TCOORD(L,2)
547 NET(TCOORD(L,1),2) = TCOORD(L,3)
548 NET(TCOORD(L,1),3) = TCOORD(L,4)
549 END DO
550 NET(MON,1) = XOLD
551 NET(MON,2) = YOLD
552 NET(MON,3) = ZOLD
553 GO TO 120
554 END IF
555 END IF
556 END DO
557 END IF
558 CALL NEIGHBORS()
559 120 CALL ENERGY(ENEW)
560 DELTAE = ENEW - EOLD
561
562 IF (DELTAE.LE.0.0DO) THEN
563 TOTALEN = ENEW
564 EOLD = ENEW
565 NOLD = TOTALN
566 END IF
567
568 IF (DELTAE.GT.0.0DO) THEN
569 WTRAN = EXP(-DELTAE/(0.008314472 * TEMPREF))
570 COIN = RANDF()
571 IF (WTRAN.GT.COIN) THEN
572 TOTALEN = ENEW
573 EOLD = ENEW
574 NOLD = TOTALN
575 ELSE
576 NET(MON,1) = XOLD
577 NET(MON,2) = YOLD
578 NET(MON,3) = ZOLD
579 LABEL(MON) = LOLD
580 TOTALEN = EOLD
581 TOTALN = NOLD
582 DO N = POSI, POSF
583 ARRAY(N,2) = TMARRA(N,2)
584 ARRAY(N,3) = TMARRA(N,3)
585 ARRAY(N,4) = TMARRA(N,4)
586 ARRALABEL(N,1) = TLABEL(N,1)
587 ARRALABEL(N,2) = TLABEL(N,2)
588 END DO
589 IF (MVEG.EQ.1.AND.NCOMM.EQ.1) THEN
590 DO I = 1, CCONT
591 NET(TCOORD(I,1),1) = TCOORD(I,2)
592 NET(TCOORD(I,1),2) = TCOORD(I,3)
593 NET(TCOORD(I,1),3) = TCOORD(I,4)
594 END DO
595 END IF
596 END IF
597 RES = K / TIMEP
598 RES2 = RES * TIMEP
599 IF (RES2.EQ.K) THEN
600 CALL NEIGHBORS()
601 CALL AVERAGE()
602 TSTOP = TIME()
603 SEC = INT(TSTOP - START)
604 OPEN (UNIT = 2,FILE = VECT(2),STATUS = 'OLD', ACCESS = 'APPEND')
605 OPEN (UNIT = 3,FILE = FTRAJ, STATUS = 'OLD', ACCESS = 'APPEND')
606 OPEN (UNIT = 8,FILE = ARRFIL, STATUS = 'OLD',ACCESS = 'APPEND')
607 OPEN (UNIT = 4,FILE = FILER, STATUS='OLD',ACCESS = 'APPEND')
608
609 WRITE(2,'(1X,','***',1X,I8,3X,F12.4,3X,I4,6X,I3,6X,I4,4X,F8.2,7X,
610 : F6.2,1X,','***')')
611 : K, EOLD, TOTALN, NMIN, NMAX, AVRG, SEC
612
613 WRITE(3,*) NPAR
614 WRITE(3,*) K
615 DO I = 1, NPAR
616 WRITE(3,*) LABEL(I), NET(I,1), NET(I,2), NET(I,3)
617 END DO
618
619 WRITE(8,*) 'STEP: ', K
620 DO I = 1, NARRAY
621 WRITE(8,*) ARRALABEL(I,1), ARRALABEL(I,2),
622 : ARRAY(I,1), ARRAY(I,2), ARRAY(I,3), ARRAY(I,4)
623 END DO
624 WRITE(8,*)
625 WRITE(4,*) 'STEP: ', K
626 WRITE(4,*) 'NEIGHBORS: ', CONT1
627 DO I = 1, CONT1
628 WRITE(4,*) NLIST(I,1), NLIST(I,2), NLIST(I,3)
629 END DO
630 CLOSE(2)
631 CLOSE(3)
632 CLOSE(8)
633 CLOSE(4)
634 END IF
635 999 CONTINUE
636

```

```

641 OPEN (UNIT = 2, FILE = VECT(2), STATUS = 'OLD', ACCESS = 'APPEND')652 SECONDS = TOTALTIME - DFLOAT ( HOURS * 3600 + MINUTES * 60 )
642 WRITE(2,*) ('*', I = 1, 80) 653 WRITE(2,*) ('-', I = 1, 80)
643 WRITE(2,'(1X,A,21X,A,20X,A)') 654 WRITE(2,'(1X,A2,22X,A10,2X,15,37X,A2)')
644 : '***', ' Normal Termination for Simulation', '***' 655 : '***', 'Hours: ', HOURS, '***'
645 WRITE (2,'(1x,A7,12X,A15,1X,A24,14x,A7)') 656 WRITE(2,'(1X,A2,22X,A10,2X,15,37X,A2)')
646 : '*****', ' ENDED ON: ', FDATE(), '*****' 657 : '***', 'Minutes: ', MINUTES, '***'
647 TIMESTOP = CPUTIME() 658 WRITE(2,'(1X,A2,22X,A10,3X,F4.1,37X,A2)')
648 TOTALTIME = TIMESTOP - TSTART 659 : '***', 'Seconds: ', SECONDS, '***'
649 INTTIME = INT ( TOTALTIME ) 660 WRITE(2,*) '***', ('-', I = 1, 76), '***'
650 HOURS = INTTIME / 3600 661 CLOSE(2)
651 MINUTES = ( INTTIME - HOURS * 3600 ) / 60 662 END SUBROUTINE

```

Archivo energy.f

```

1 C ***** C
2 C ** SUB-RUTINA PARA EL CALCULO DE LA ENERGIA ** C
3 C ** DE ISING. LA ECUACION EMPLEADA ES LA SI- ** C
4 C ** GUIENTE: ** C
5 C ** E(total) = SUM[E(q1,q2)] ** C
6 C ** ** C
7 C ** LA ENERGIA DEPENDE DE LA MANERA EN COMO LOS ** C
8 C ** MONOMEROS VECINALES ESTAN ORIENTADOS. ** C
9 C ** LOS VECINOS SE LOCALIZAN EMPLEANDO LA SUB- ** C
10 C ** RUTINA NEIGHBORS() Y LUEGO SE DETERMINA ** C
11 C ** QUIENES ESTAN EN CONTACTO. ** C
12 C ***** C
13 C ** EL TIPO DE CONTACTO SE DETERMINA A PARTIR DE ** C
14 C ** LA MATRIZ DE VECTORES ARRAY(LINES,4) Y LUEGO ** C
15 C ** SE COMPARA CON LOS PARAMETROS DE ENERGIA ** C
16 C ** QUE HA SIDO PREVIAMENTE CALCULADO. ** C
17 C ***** C
18 C ** 1. DETERMINAR EL TIPO DE CONTACTO ** C
19 C ** 2. DETERMINAR EL TIPO DE ORIENTACION ** C
20 C ** 3. ACUMULAR EL VALOR DE LA ENERGIA ** C
21 C ***** C
22
23 SUBROUTINE ENERGY(ENERIS)
24 INCLUDE 'common_dyn.f'
25 INTEGER MONOA(LINES,3), MONOB(LINES,3), POSIC1, POSIC2
26 INTEGER POSP, POSF, A1, A2, B1, B2
27 REAL*8 DXA, DYA, DZA, DXB, DYB, DZB, DOT, DOT1, DOT2
28 INTEGER ACUM, MCX1, MCY1, MCZ1, MCX2, MCY2, MCZ2
29 INTEGER DISTX, DISTY, DISTZ, DX1, DY1, DZ1, DX2, DY2, DZ2
30 REAL*8 DIST, DIHC1, DIHC2, DIHP1, DIHP2, ENERIS, EPAR
31 INTEGER TYPEA, TYPEB, TYPEC, THETA
32 CHARACTER*5 PARES(LINES,2), PARC(LINES,2), PARB(LINES,2)
33 CHARACTER*5 PARA(LINES,2)
34 INTEGER TEMPA(LINES,3), TEMPB(LINES,3), DX, DY, DZ
35 INTEGER NROTA, IPAR
36 CHARACTER*5 LAB(LINES,2), TEMPC, TEMPD
37 ACUM = 0
38 IPAR = 0
39 ENERIS = 0.000
40 C OPEN (UNIT = 2, FILE = VECT(2), STATUS = 'OLD', ACCESS = 'APPEND')
41 C WRITE(2,*)
42 C WRITE(2,*) '*****'
43 C WRITE(2,*) '** SUB-RUTINA ENERGY **'
44 C WRITE(2,*) '*****'
45 DO 999 I = 1, TOTALN
46 ACUM = 0
47 C WRITE(*,*) 'CONTACTOS: ', NEIGHB(I,1), NEIGHB(I,2)
48 C ***** C
49 C ** PRIMERO REALIZAMOS OPERACIONES DE TRASLACION ** C
50 C ** PARA CADA MONOMERO. ** C
51 C ***** C
52 C ** RE-ESCALAR PRIMERO PARA EL MONOMERO A ** C
53 C ***** C
54 POSIC1 = NEIGHB(I,1)
55 DO J = 1, TARRAY
56 IF (POSIC1.EQ.ARRAY(J,1)) THEN
57 ACUM = ACUM + 1
58 IF (ACUM.EQ.1.) THEN
59 MONOA(ACUM,1) = ARRAY(J,2) + NET(POSIC1,1)
60 MONOA(ACUM,2) = ARRAY(J,3) + NET(POSIC1,2)
61 MONOA(ACUM,3) = ARRAY(J,4) + NET(POSIC1,3)
62 LAB(ACUM,1) = ARRALABEL(J,2)
63 MCX1 = MONOA(ACUM,1)
64 MCY1 = MONOA(ACUM,2)
65 MCZ1 = MONOA(ACUM,3)
66 END IF
67 IF (ACUM.GT.1) THEN
68 MONOA(ACUM,1) = ARRAY(J,2) + MONOA(1,1)
69 MONOA(ACUM,2) = ARRAY(J,3) + MONOA(1,2)
70 MONOA(ACUM,3) = ARRAY(J,4) + MONOA(1,3)
71 LAB(ACUM,1) = ARRALABEL(J,2)
72 END IF
73 END IF
74 END DO
75
76 C ***** C
77 C ** RE-ESCALAR SEGUIDO PARA EL MONOMERO B ** C
78 C ***** C
79 POSIC2 = NEIGHB(I,2)
80 ACUM = 0
81 DO J = 1, TARRAY
82 IF (POSIC2.EQ.ARRAY(J,1)) THEN
83 ACUM = ACUM + 1
84 IF (ACUM.EQ.1.) THEN
85 MONOB(ACUM,1) = ARRAY(J,2) + NET(POSIC2,1)
86 MONOB(ACUM,2) = ARRAY(J,3) + NET(POSIC2,2)
87 MONOB(ACUM,3) = ARRAY(J,4) + NET(POSIC2,3)
88 LAB(ACUM,2) = ARRALABEL(J,2)
89 MCX2 = MONOB(ACUM,1)
90 MCY2 = MONOB(ACUM,2)
91 MCZ2 = MONOB(ACUM,3)
92 END IF
93 IF (ACUM.GT.1) THEN
94 MONOB(ACUM,1) = ARRAY(J,2) + MONOB(1,1)
95 MONOB(ACUM,2) = ARRAY(J,3) + MONOB(1,2)
96 MONOB(ACUM,3) = ARRAY(J,4) + MONOB(1,3)
97 LAB(ACUM,2) = ARRALABEL(J,2)
98 END IF
99 END IF
100 END DO
101
102 C ***** C
103 C ** TOCA HACER OTRA VERIFICACION DE LA POSICION ** C
104 C ** DEL MONOMERO B, YA QUE SIEMPRE DEBE ESTAR POR** C
105 C ** DEL MONOMERO A. TOCO ASI ** C
106 C ***** C
107 DX = MCX2 - MCX1
108 DY = MCY2 - MCY1
109 DZ = MCZ2 - MCZ1
110 C WRITE(2,*) 'PAR DE VECINOS NUMERO: ', I
111 C WRITE(*,*) 'DIFERENCIAS: ', DX, DY, DZ
112
113 C ***** C
114 C ** SI EL MONOMERO B ESTA POR DEBAJO SE INTERCAM- ** C
115 C ** LOS MONOMEROS PARA PODER FACILITAR LA ENERGIA** C
116 C ** DE ISING. ** C
117 C ***** C
118 IF (DX.EQ.0.AND.DY.EQ.0.AND.DZ.LT.0) THEN
119 C WRITE(*,*) 'DISTANCIADOS SOBRE EL EJE Z'
120 DO K = 1, 5
121 TEMP = POSIC1
122 POSIC1 = POSIC2
123 POSIC2 = TEMP
124 TEMPA(K,1) = MONOA(K,1)
125 TEMPA(K,2) = MONOA(K,2)
126 TEMPA(K,3) = MONOA(K,3)
127 MONOA(K,1) = MONOB(K,1)
128 MONOA(K,2) = MONOB(K,2)
129 MONOA(K,3) = MONOB(K,3)
130 MONOB(K,1) = TEMPA(K,1)
131 MONOB(K,2) = TEMPA(K,2)
132 MONOB(K,3) = TEMPA(K,3) + 1
133 TEMPC = LAB(ACUM,1)
134 LAB(ACUM,1) = LAB(ACUM,2)
135 LAB(ACUM,2) = TEMPC
136
137 END DO
138 END IF
139
140 IF (DX.EQ.0.AND.DY.LT.0.AND.DZ.EQ.0) THEN
141 C WRITE(*,*) 'DISTANCIADOS SOBRE EL EJE Y'
142 DO K = 1, 5
143 TEMP = POSIC1
144 POSIC1 = POSIC2

```

```

145 POSIC2 = TEMP
146 TEMPA(K,1) = MONOA(K,1)
147 TEMPA(K,2) = MONOA(K,2)
148 TEMPA(K,3) = MONOA(K,3)
149 MONOA(K,1) = MONOB(K,1)
150 MONOA(K,2) = MONOB(K,2)
151 MONOA(K,3) = MONOB(K,3)
152 MONOB(K,1) = TEMPA(K,1)
153 MONOB(K,2) = TEMPA(K,2) + 1
154 MONOB(K,3) = TEMPA(K,3)
155 TEMPC = LAB(ACUM,1)
156 LAB(ACUM,1) = LAB(ACUM,2)
157 LAB(ACUM,2) = TEMPC
158 END DO
159 END IF
160
161 IF (DX.LT.0.AND.DY.EQ.0.AND.DZ.EQ.0) THEN
162 C WRITE(*,*) 'DISTANCIADOS SOBRE EL EL EJE X'
163 DO K = 1, 5
164 TEMP = POSIC1
165 POSIC1 = POSIC2
166 POSIC2 = TEMP
167 TEMPA(K,1) = MONOA(K,1)
168 TEMPA(K,2) = MONOA(K,2)
169 TEMPA(K,3) = MONOA(K,3)
170 MONOA(K,1) = MONOB(K,1)
171 MONOA(K,2) = MONOB(K,2)
172 MONOA(K,3) = MONOB(K,3)
173 MONOB(K,1) = TEMPA(K,1) + 1
174 MONOB(K,2) = TEMPA(K,2)
175 MONOB(K,3) = TEMPA(K,3)
176 TEMPC = LAB(ACUM,1)
177 LAB(ACUM,1) = LAB(ACUM,2)
178 LAB(ACUM,2) = TEMPC
179 END DO
180 END IF
181
182 IF (DX.EQ.0.AND.DY.EQ.0.AND.DZ.EQ.1) THEN
183 C WRITE(*,*) 'DISTANCIADOS SOBRE EL EL EJE Z'
184 DO K = 1, 5
185 MONOB(K,3) = MONOB(K,3) + 1
186 END DO
187 END IF
188
189 IF (DX.EQ.0.AND.DY.EQ.1.AND.DZ.EQ.0) THEN
190 C WRITE(*,*) 'DISTANCIADOS SOBRE EL EL EJE Y'
191 DO K = 1, 5
192 MONOB(K,2) = MONOB(K,2) + 1
193 END DO
194 END IF
195
196 IF (DX.EQ.1.AND.DY.EQ.0.AND.DZ.EQ.0) THEN
197 C WRITE(*,*) 'DISTANCIADOS SOBRE EL EL EJE X'
198 DO K = 1, 5
199 MONOB(K,1) = MONOB(K,1) + 1
200 END DO
201 END IF
202
203 C ***** C
204 C ** DETERMINAR EL TIPO DE CONTACTO QUE SE PRE- ** C
205 C ** SENTA EN EL PAR DE MONOMERO VECINALES. ** C
206 C ** PARA ESTE CASO, PRIMERO SE NECESITA DETER- ** C
207 C ** MINAR LOS CONTACTOS 1-1. EL RESTO SE PUEDE ** C
208 C ** DEDUCIR CON LA MINIMA DISTANCIA ENTRE LOS ** C
209 C ** PUNTOS DE CADA MONOMERO. ** C
210 C ***** C
211 C ** ACA TENEMOS OTROS PROBLEMA. HAY QUE DETER- ** C
212 C ** MINAR SI EL CONTACTO ES DE TIPO 1-1 SIN ES ** C
213 C ** ASI, USAR EL CRITERIO DE MINIMA DISTANCIA ** C
214 C ** DONDE APARECEN DOS OPCIONES: A) CUANDO DIST ** C
215 C ** ES IGUAL A UNO (PARA CONTACTOS 1-A O A-1) ** C
216 C ** B) CUANDO DIST ES IGUAL A CERO A:B.NE.1) ** C
217 C ***** C
218 TYPEA = 0
219 TYPEB = 0
220 TYPEC = 0
221 DO J = 1, ACUM
222 DO K = 1, 5
223 DX1 = MONOA(J,1)
224 DY1 = MONOA(J,2)
225 DZ1 = MONOA(J,3)
226 DX2 = MONOB(K,1)
227 DY2 = MONOB(K,2)
228 DZ2 = MONOB(K,3)
229 DISTX = ABS((DX1 - DX2)**2)
230 DISTY = ABS((DY1 - DY2)**2)
231 DISTZ = ABS((DZ1 - DZ2)**2)
232 DIST = (DISTX + DISTY + DISTZ)**(0.5)
233 C WRITE(*,*) J, K, DIST
234
235 IF (DIST.EQ.0.OD0) THEN
236 TYPEC = TYPEC + 1
237 PARC(1,1) = LAB(J,1)
238 PARC(1,2) = LAB(K,1)
239 END IF
240
241 IF (DIST.EQ.1.OD0) THEN
242 TYPEB = TYPEB + 1
243 PARB(1,1) = LAB(J,1)
244 PARB(1,2) = LAB(K,1)
245 END IF
246
247 IF (DIST.EQ.2.OD0) THEN
248 TYPEA = TYPEA + 1
249 TEMPD = ARRALABEL(POSIC1,1)
250 IF (TEMPD.EQ.'CB2M') THEN
251 PARA(1,1) = 'C1'
252 END IF
253 IF (TEMPD.EQ.'FB2M') THEN
254 PARA(1,1) = 'F1'
255 END IF
256 TEMPD = ARRALABEL(POSIC2,1)
257 IF (TEMPD.EQ.'CB2M') THEN
258 PARA(1,2) = 'C1'
259 END IF
260 IF (TEMPD.EQ.'FB2M') THEN
261 PARA(1,2) = 'F1'
262 END IF
263 END IF
264 END DO
265 END DO
266
267 IF (TYPEA.EQ.5.AND.TYPEB.EQ.0.AND.TYPEC.EQ.0) THEN
268 C WRITE(2,*) 'CONTACTO 1-1 ENCONTRADO: ', PARA(1,1), PARA(1,2)
269 C WRITE(2,*) 'VECINOS: ', POSIC1, POSIC2
270 C WRITE(2,*) 'BUSCANDO CON LISTADO DE PARAMETROS'
271 DO K = 1, CONTE
272 IF (LEER(K,1).EQ.'PARAM') THEN
273 READ(LEER(K,6),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) NROTA
274 READ(LEER(K,5),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) EPAR
275 IF (PARA(1,1).EQ.LEER(K,2).AND.PARA(1,2).EQ.LEER(K,3)) THEN
276 C WRITE(2,*) 'ENCONTRADO CON LISTADO DE PARAMETROS: ', K
277 C ***** C
278 C ** AHORA COMPARAR CON LA LISTA DE PARAMETROS Y ** C
279 C ** DETERMINAR A QUE ORIENTACION Y ENERGIA ** C
280 C ** CORRESPONDE. ** C
281 C ***** C
282 POSP = K + 1
283 POSF = K + NROTA
284 FIND = 0
285 DO L = POSP, POSF
286 READ(LEER(L,1),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) A1
287 READ(LEER(L,2),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) A2
288 READ(LEER(L,3),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) B1
289 READ(LEER(L,4),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) B2
290 READ(LEER(L,5),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) DIHP1
291 READ(LEER(L,6),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) DIHP2
292 DXA = MONOA(A2,1) - MONOA(A1,1)
293 DYA = MONOA(A2,2) - MONOA(A1,2)
294 DZA = MONOA(A2,3) - MONOA(A1,3)
295 DXB = MONOB(B1,1) - MONOB(B2,1)
296 DYB = MONOB(B1,2) - MONOB(B2,2)
297 DZB = MONOB(B1,3) - MONOB(B2,3)
298 DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
299 DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2) *
300 : (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2))))
301 DOT = (ACOS( DOT1 /DOT2 )) * (180.0 / PI)
302 DIHC1 = DNINT(DOT)
303 DXA = MONOB(A1,1) - MONOB(A2,1)
304 DYA = MONOB(A1,2) - MONOB(A2,2)
305 DZA = MONOB(A1,3) - MONOB(A2,3)
306 DXB = MONOA(B2,1) - MONOA(B1,1)
307 DYB = MONOA(B2,2) - MONOA(B1,2)
308 DZB = MONOA(B2,3) - MONOA(B1,3)
309 DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
310 DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2) *
311 : (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2))))
312 DOT = (ACOS( DOT1 /DOT2 )) * (180.0 / PI)
313 DIHC2 = DNINT(DOT)
314 C WRITE(2,401) 'VALORES: ', A1, A2, B1, B2,
315 C : DIHC1, DIHC2, DIHP1, DIHP2
316 C401 FORMAT(A9, 3X, I2, 1X, I2, 1X, I2, 2X, I2, 3X,
317 C : F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4)
318 IF (DIHC1.NE.DIHP1.OR.DIHC2.NE.DIHP2) THEN
319 C WRITE(2,*) 'NO SIRVE'
320 FIND = 1
321 END IF
322 END DO
323
324 IF (FIND.EQ.0) THEN
325 C WRITE(2,*) 'ENCONTRADO ALGO'
326 C WRITE(2,*) 'ENERGIA DEL VECINO: ', EPAR
327 ENERIS = ENERIS + EPAR
328 GOTO 999

```

```

329      END IF
330      END IF
331      END IF
332      END DO
333 C     HASTA ACA
334      END IF
335
336      IF (TYPEB.EQ.1) THEN
337 C     DESDE AQUI
338 c     WRITE(2,*) 'CONTACTO TIPOB (1-A/A-1) ENCONTRADO: ', PARB(1,1),
339 c     : PARB(1,2)
340 c     WRITE(2,*) 'VECINOS: ', POSIC1, POSIC2
341      DO K = 1, CONTE
342      IF (LEER(K,1).EQ.'PARAM') THEN
343      READ(LEER(K,6),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) NROTA
344      READ(LEER(K,5),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) EPAR
345      IF (PARC(1,1).EQ.LEER(K,2).AND.PARB(1,2).EQ.LEER(K,3)) THEN
346 c     WRITE(2,*) 'ENCONTRADO CON LISTADO DE PARAMETROS: ', K
347 C *****
348 C ** AHORA COMPARAR CON LA LISTA DE PARAMETROS Y ** C
349 C ** DETERMINAR A QUE ORIENTACION Y ENERGIA ** C
350 C ** CORRESPONDE. ** C
351 C *****
352      POSP = K + 1
353      POSF = K + NROTA
354      FIND = 0
355      DO L = POSP, POSF
356      READ(LEER(L,1),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) A1
357      READ(LEER(L,2),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) A2
358      READ(LEER(L,3),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) B1
359      READ(LEER(L,4),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) B2
360      READ(LEER(L,5),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) DIHP1
361      READ(LEER(L,6),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) DIHP2
362      DXA = MONOA(A2,1) - MONOA(A1,1)
363      DYA = MONOA(A2,2) - MONOA(A1,2)
364      DZA = MONOA(A2,3) - MONOA(A1,3)
365      DXB = MONOB(B1,1) - MONOB(B2,1)
366      DYB = MONOB(B1,2) - MONOB(B2,2)
367      DZB = MONOB(B1,3) - MONOB(B2,3)
368      DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
369      DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2)) *
370 : (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2)))
371      DOT = (ACOS( DOT1 / DOT2 )) * (180.0 / PI)
372      DIHC1 = DNINT(DOT)
373      DXA = MONOB(A1,1) - MONOB(A2,1)
374      DYA = MONOB(A1,2) - MONOB(A2,2)
375      DZA = MONOB(A1,3) - MONOB(A2,3)
376      DXB = MONOA(B2,1) - MONOA(B1,1)
377      DYB = MONOA(B2,2) - MONOA(B1,2)
378      DZB = MONOA(B2,3) - MONOA(B1,3)
379      DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
380      DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2)) *
381 : (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2)))
382      DOT = (ACOS( DOT1 / DOT2 )) * (180.0 / PI)
383      DIHC2 = DNINT(DOT)
384 c     WRITE(2,400) 'VALORES: ', A1, A2, B1, B2,
385 c     : DIHC1, DIHC2, DIHP1, DIHP2
386 c400  FORMAT(A9, 3X, I2, 1X, I2, 1X, I2, 2X, I2, 3X,
387 c     : F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4)
388      IF (DIHC1.NE.DIHP1.OR.DIHC2.NE.DIHP2) THEN
389 c     WRITE(2,*) 'NO SIRVE'
390      FIND = 1
391      END IF
392      END DO
393
394      IF (FIND.EQ.0) THEN
395 c     WRITE(2,*) 'ENCONTRADO TAMBIEN ALGO'
396 c     WRITE(2,*) 'ENERGIA DEL VECINO: ', EPAR
397      ENERIS = ENERIS + EPAR
398      GOTO 999
399      END IF
400      END IF
401
402 C     ACA VA CUANDO ES INVERSO
403      IF (PARB(1,1).EQ.LEER(K,3).AND.PARB(1,2).EQ.LEER(K,2)) THEN
404 c     WRITE(2,*) 'ENCONTRADO CON LISTADO DE PARAMETROS: ', K
405 C *****
406 C ** AHORA COMPARAR CON LA LISTA DE PARAMETROS Y ** C
407 C ** DETERMINAR A QUE ORIENTACION Y ENERGIA ** C
408 C ** CORRESPONDE. ** C
409 C *****
410      POSP = K + 1
411      POSF = K + NROTA
412      FIND = 0
413      DO L = POSP, POSF
414      READ(LEER(L,1),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) A1
415      READ(LEER(L,2),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) A2
416      READ(LEER(L,3),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) B1
417      READ(LEER(L,4),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) B2
418      READ(LEER(L,5),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) DIHP1
419      READ(LEER(L,6),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) DIHP2
420      DXA = MONOA(A2,1) - MONOA(A1,1)
421      DYA = MONOA(A2,2) - MONOA(A1,2)
422      DZA = MONOA(A2,3) - MONOA(A1,3)
423      DXB = MONOB(B1,1) - MONOB(B2,1)
424      DYB = MONOB(B1,2) - MONOB(B2,2)
425      DZB = MONOB(B1,3) - MONOB(B2,3)
426      DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
427      DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2)) *
428 : (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2)))
429      DOT = (ACOS( DOT1 / DOT2 )) * (180.0 / PI)
430      DIHC1 = DNINT(DOT)
431      DXA = MONOB(A1,1) - MONOB(A2,1)
432      DYA = MONOB(A1,2) - MONOB(A2,2)
433      DZA = MONOB(A1,3) - MONOB(A2,3)
434      DXB = MONOA(B2,1) - MONOA(B1,1)
435      DYB = MONOA(B2,2) - MONOA(B1,2)
436      DZB = MONOA(B2,3) - MONOA(B1,3)
437      DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
438      DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2)) *
439 : (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2)))
440      DOT = (ACOS( DOT1 / DOT2 )) * (180.0 / PI)
441      DIHC2 = DNINT(DOT)
442 c     WRITE(2,403) 'VALORES: ', A1, A2, B1, B2,
443 c     : DIHC1, DIHC2, DIHP1, DIHP2
444 c403  FORMAT(A9, 3X, I2, 1X, I2, 1X, I2, 2X, I2, 3X,
445 c     : F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4)
446      IF (DIHC1.NE.DIHP2.OR.DIHC2.NE.DIHP1) THEN
447 c     WRITE(2,*) 'NO SIRVE'
448      FIND = 1
449      END IF
450      END DO
451
452      IF (FIND.EQ.0) THEN
453 c     WRITE(2,*) 'ENCONTRADO TAMBIEN ALGO'
454 c     WRITE(2,*) 'ENERGIA DEL VECINO: ', EPAR
455      ENERIS = ENERIS + EPAR
456      GOTO 999
457      END IF
458      END IF
459 C     TERMINA LO INVERO
460      END IF
461      END DO
462 C     HASTA ACA
463      END IF
464
465      IF (TYPEB.EQ.1) THEN
466 c     WRITE(2,*) 'CONTACTO TIPOC (A:B.NE.1) ENCONTRADO: ', PARC(1,1),
467 c     : PARC(1,2)
468 c     WRITE(2,*) 'VECINOS: ', POSIC1, POSIC2
469      DO K = 1, CONTE
470      IF (LEER(K,1).EQ.'PARAM') THEN
471      READ(LEER(K,6),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) NROTA
472      READ(LEER(K,5),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) EPAR
473      IF (PARC(1,1).EQ.LEER(K,2).AND.PARC(1,2).EQ.LEER(K,3)) THEN
474 c     WRITE(2,*) 'ENCONTRADO CON LISTADO DE PARAMETROS: ', K
475 C *****
476 C ** AHORA COMPARAR CON LA LISTA DE PARAMETROS Y ** C
477 C ** DETERMINAR A QUE ORIENTACION Y ENERGIA ** C
478 C ** CORRESPONDE. ** C
479 C *****
480      POSP = K + 1
481      POSF = K + NROTA
482      FIND = 0
483      DO L = POSP, POSF
484      READ(LEER(L,1),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) A1
485      READ(LEER(L,2),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) A2
486      READ(LEER(L,3),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) B1
487      READ(LEER(L,4),'(I5)',IOSTAT = ERRSTAT) B2
488      READ(LEER(L,5),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) DIHP1
489      READ(LEER(L,6),'(F12.4)',IOSTAT = ERRSTAT) DIHP2
490      DXA = MONOA(A2,1) - MONOA(A1,1)
491      DYA = MONOA(A2,2) - MONOA(A1,2)
492      DZA = MONOA(A2,3) - MONOA(A1,3)
493      DXB = MONOB(B1,1) - MONOB(B2,1)
494      DYB = MONOB(B1,2) - MONOB(B2,2)
495      DZB = MONOB(B1,3) - MONOB(B2,3)
496      DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
497      DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2)) *
498 : (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2)))
499      DOT = (ACOS( DOT1 / DOT2 )) * (180.0 / PI)
500      DIHC1 = DNINT(DOT)
501      DXA = MONOB(A1,1) - MONOB(A2,1)
502      DYA = MONOB(A1,2) - MONOB(A2,2)
503      DZA = MONOB(A1,3) - MONOB(A2,3)
504      DXB = MONOA(B2,1) - MONOA(B1,1)
505      DYB = MONOA(B2,2) - MONOA(B1,2)
506      DZB = MONOA(B2,3) - MONOA(B1,3)
507      DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
508      DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2)) *
509 : (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2)))
510      DOT = (ACOS( DOT1 / DOT2 )) * (180.0 / PI)
511      DIHC2 = DNINT(DOT)
512 c     WRITE(2,404) 'VALORES: ', A1, A2, B1, B2,

```

```

513 c      :      DIHC1, DIHC2, DIHP1, DIHP2
514 c404    :      FORMAT(A9, 3X, I2, 1X, I2, 1X, I2, 2X, I2, 3X,
515 c      :      F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4)
516        :      IF (DIHC1.NE.DIHP1.OR.DIHC2.NE.DIHP2) THEN
517 c      :      WRITE(2,*) 'NO SIRVE'
518        :      FIND = 1
519        :      END IF
520        :      END DO
521
522        :      IF (FIND.EQ.0) THEN
523 c      :      WRITE(2,*) 'ENCONTRADO TAMBIEN ALGO'
524 c      :      WRITE(2,*) 'ENERGIA DEL VECINO: ', EPAR
525        :      ENERIS = ENERIS + EPAR
526        :      GOTO 999
527        :      END IF
528        :      END IF
529
530 c      :      ACA VA CUANDO ES INVERSO
531        :      IF (PARC(1,1).NE.PARC(1,2).AND.PARC(1,1).EQ.LEER(K,3)
532        :      .AND.PARC(1,2).EQ.LEER(K,2)) THEN
533 c      :      WRITE(2,*) 'ENCONTRADO CON LISTADO DE PARAMETROS: ', K
534 c      :      *****
535 c      :      ** AHORA COMPARAR CON LA LISTA DE PARAMETROS Y ** C
536 c      :      ** DETERMINAR A QUE ORIENTACION Y ENERGIA ** C
537 c      :      ** CORRESPONDE. ** C
538 c      :      *****
539        :      POSP = K + 1
540        :      POSF = K + NROTA
541        :      FIND = 0
542        :      DO L = POSP, POSF
543        :      READ (LEER(L,1), '(I5)', IOSTAT = ERRSTAT) A1
544        :      READ (LEER(L,2), '(I5)', IOSTAT = ERRSTAT) A2
545        :      READ (LEER(L,3), '(I5)', IOSTAT = ERRSTAT) B1
546        :      READ (LEER(L,4), '(I5)', IOSTAT = ERRSTAT) B2
547        :      READ (LEER(L,5), '(F12.4)', IOSTAT = ERRSTAT) DIHP1
548        :      READ (LEER(L,6), '(F12.4)', IOSTAT = ERRSTAT) DIHP2
549        :      DXA = MONOA(A2,1) - MONOA(A1,1)
550        :      DYA = MONOA(A2,2) - MONOA(A1,2)
551        :      DZA = MONOA(A2,3) - MONOA(A1,3)
552        :      DXB = MONOB(B1,1) - MONOB(B2,1)
553        :      DYB = MONOB(B1,2) - MONOB(B2,2)
554        :      DZB = MONOB(B1,3) - MONOB(B2,3)
555        :      DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
556        :      DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2)) *
557        :      (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2)))
558        :      DOT = (ACOS( DOT1 /DOT2 )) * (180.0 / PI)
559        :      DIHC1 = DNINT(DOT)
560
561        :      DXA = MONOB(A1,1) - MONOB(A2,1)
562        :      DYA = MONOB(A1,2) - MONOB(A2,2)
563        :      DZA = MONOB(A1,3) - MONOB(A2,3)
564        :      DXB = MONOA(B2,1) - MONOA(B1,1)
565        :      DYB = MONOA(B2,2) - MONOA(B1,2)
566        :      DZB = MONOA(B2,3) - MONOA(B1,3)
567        :      DOT1 = DXA * DXB + DYA * DYB + DZA * DZB
568        :      DOT2 = SQRT((DBLE(DXA**2 + DYA**2 + DZA**2)) *
569        :      (DBLE(DXB**2 + DYB**2 + DZB**2)))
570        :      DOT = (ACOS( DOT1 /DOT2 )) * (180.0 / PI)
571 c      :      DIHC2 = DNINT(DOT)
572 c      :      WRITE(2,405) 'VALORES: ', A1, A2, B1, B2,
573 c405    :      FORMAT(A9, 3X, I2, 1X, I2, 1X, I2, 2X, I2, 3X,
574 c      :      F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4, 2X, F12.4)
575        :      IF (DIHC1.NE.DIHP2.OR.DIHC2.NE.DIHP1) THEN
576 c      :      WRITE(2,*) 'NO SIRVE'
577        :      FIND = 1
578        :      END IF
579        :      END DO
580
581        :      IF (FIND.EQ.0) THEN
582 c      :      WRITE(2,*) 'ENCONTRADO TAMBIEN ALGO'
583 c      :      WRITE(2,*) 'ENERGIA DEL VECINO: ', EPAR
584        :      ENERIS = ENERIS + EPAR
585        :      GOTO 999
586        :      END IF
587        :      END IF
588 c      :      TERMINA LO INVERO
589        :      END IF
590        :      END DO
591 c      :      HASTA ACA
592        :      END IF
593
594 c      :      WRITE(2,*) 'LISTADO DE VECTORES:'
595 c      :      DO J = 1, ACUM
596 c      :      WRITE(2,*) LAB(J,1), MONOA(J,1), MONOA(J,2), MONOA(J,3),
597 c      :      LAB(J,2), MONOB(J,1), MONOB(J,2), MONOB(J,3)
598 c      :      END DO
599
600 c      :      WRITE(2,*)
601 c      :      ESTE END DO ES DEL PRIMERO CICLO (NEIGHBOR)
602 999    :      CONTINUE
603 c      :      WRITE(2,*) 'ENERGIA TOTAL: ', ENERIS
604 c      :      RETURN
605        :      END SUBROUTINE

```

Archivo neighbors.f

```

1 C *****
2 C ** ESTA SUB-RUTINA PERMITE ENCONTRAR TODOS LOS ** C
3 C ** PARES DE MONOMEROS VECINALES ** C
4 C ** SE CONSIDERAN SOLO LOS VECINOS QUE ESTAN EN ** C
5 C ** EL MISMO EJE Y ESTAN SEPARADOS SOLAMENTE POR ** C
6 C ** UNA UNIDAD DE DISTANCIA EN LA MALLA 3D ** C
7 C ** EJEMPLO: |-----|-----|-----| ** C
8 C **          |-----|-----|-----| ** C
9 C **          | CB2M | | CB2M | | ** C
10 C ** y        |-----|-----|-----| ** C
11 C **          | CB2M | CB2M | CB2M | | ** C
12 C ** |-----|-----|-----| ** C
13 C ** /-----x |-----|-----|-----| ** C
14 C ** /-----x |-----|-----|-----| ** C
15 C ** z          |-----|-----|-----| ** C
16 C *****
17 C ** USAMOS LA VARIABLE CONT PARA VERIFICAR QUE ** C
18 C ** EL PAR DE MONOMERO SE ENCUENTRAN ALINEADOS ** C
19 C ** SOBRE UN EJE CARTESIANA. ** C
20 C ** ESTO SE VERIFICA CALCULANDO LA DISTANCIA EN ** C
21 C ** CADA EJE (X,Y,Z), USAMOS LAS VARIABLES DIST- ** C
22 C *****
23 C ** CUANDO UN PAR DE MONOMEROS SON VECINALES, ** C
24 C ** CADA UNO DE ELLOS SE ALMACENA EN LA MATRIX ** C
25 C ** NOMBRADA NEIGHB(LINES,2) Y LUEGO ES USADA ** C
26 C ** PARA DETERMINAR EL CONTACTO (1-2,1-3,ETC) ** C
27 C ** PARA OBTENER LA ENERGIA DE ISING ** C
28 C *****
29
30 SUBROUTINE NEIGHBORS()
31 INCLUDE 'common_dyn.f'
32 INTEGER J, CONT, DISTX, DISTY, DISTZ, REPET
33
34 c      OPEN(UNIT=2,FILE=VECT(2))
35 c      REPET = 0
36 c      CONT = 0
37 c      TOTALN = 0
38 c      DO I = 1, NPAR
39 c      CONT = 0
40 c      DO J = I + 1, NPAR
41 c      CONT = 0
42 c      DISTX = ABS(NET(I,1) - NET(J,1))
43 c      DISTY = ABS(NET(I,2) - NET(J,2))
44 c      DISTZ = ABS(NET(I,3) - NET(J,3))
45 c      IF (DISTX.EQ.1.AND.DISTY.EQ.0.AND.DISTZ.EQ.0) THEN
46 c      CONT = CONT + 1
47 c      END IF
48 c      IF (DISTX.EQ.0.AND.DISTY.EQ.1.AND.DISTZ.EQ.0) THEN
49 c      CONT = CONT + 1
50 c      END IF
51 c      IF (DISTX.EQ.0.AND.DISTY.EQ.0.AND.DISTZ.EQ.1) THEN
52 c      CONT = CONT + 1
53 c      END IF
54 c      IF (CONT.EQ.1) THEN
55 c      TOTALN = TOTALN + 1
56 c      NEIGHB(TOTALN,1) = I
57 c      NEIGHB(TOTALN,2) = J
58 c      END IF
59 c      END DO
60 c      END DO
61 c      DO I = 1, TOTALN
62 c      WRITE(*,*) NEIGHB(I,1), NEIGHB(I,2)
63 c      END DO
64 c      WRITE(*,*)
65 c      END SUBROUTINE

```

Archivo common_dyn.f

```
1 C ***** C
2 C ** ESTE ARCHIVO CONTIENE VARIABLES QUE SON USA- ** C
3 C ** DAS EN LAS DIFERENTES SUBRUTINAS DEL PROGRAMA ** C
4 C ***** C
5 INTEGER NPAR,ALEO,ISEED,I,N,K,L
6 INTEGER*4 LINES, TARRAY, NARRAY, MON
7 REAL PI
8 PARAMETER (LINES=3000000)
9 PARAMETER (PI = 3.14159265)
10 INTEGER CONTE, CONTLJ, CONTBOND, CONTLJB
11 INTEGER ACONT, BOX, TOTALN, NLIST(LINES,3)
12 INTEGER HOURS, MINUTES, INTTIME
13 REAL*8 SECONDS, AVTIME
14 REAL*8 TIMESTOP, TSTART, TOTALTIME
15 REAL*8 CPUTIME
16 CHARACTER*10 LEER(LINES,6)
17 CHARACTER*5 LABEL(LINES)
18 INTEGER NET(LINES,3), CONT1
19 CHARACTER*5 ARRALABEL(LINES,2)
20 INTEGER ARRAY(LINES,4)
21 INTEGER NEIGHB(LINES,2), NMIN, NMAX
22 CHARACTER (LEN=100) DIP(LINES),
23 : VECT(40), SITE(LINES), ARCHIVO, DIPHREE(LINES)
24 CHARACTER (LEN=1) DIPTWO(LINES)
25 CHARACTER*(80) ARG, FILE1, FILE2
26 CHARACTER (LEN=30) DIPPFOUR(LINES)
27 CHARACTER (LEN=30) TITLE
28 CHARACTER (LEN=40) FILE_PAR
29 CHARACTER (LEN=3) TRAJ_XYZ
30 CHARACTER (LEN=40) FTRAJ, ARRFILE
31 CHARACTER (LEN=100) FILER
32
33 REAL*8 LMAX, Ka, KP
34 INTEGER*4 NSTEP, TIMEP, HITS, TIMET
35 REAL*8 KBOLTZ
36 PARAMETER (KBOLTZ = 8.31447247122021d-3)
37 PARAMETER (Ka = 1.0d-7)
38 REAL*8 STEP, TEMPAV, TEMPVEL, TEMPREF, G, Q, S
39 LOGICAL PRESENT, READCOMM, LTHERMO
40 LOGICAL XMD, XMC, TRAJ
41 INTEGER ERRSTAT
42 REAL*8 VALORT, AVRG
43 CHARACTER*30 COMMANDS(40)
44 CHARACTER*30 PARMT(4)
45 LOGICAL IVEL, THERM
46
47 DATA (COMMANDS(I), I = 1,10) /
48 : 'TITLE', 'FILE_PAR','NSTEP','PRINT_STEP','VEL_SEED',
49 : 'TEMP_REF', 'FILE_TRAJ','DIM', 'NPAR', 'FILE_ARRAY' /
50
51 DATA (PARMT(I), I = 1, 4) /
52 : 'atoms', 'bonds', 'angle', 'lennard-jones' /
53
54 COMMON /PASO/ STEP, TEMPAV, TEMPVEL, TIMET, NSTEP, ACONT, BOX
55 COMMON /PRINTER/ TIMEP, CONTE, TOTALN, MON
56 COMMON /ENEMC/ TEMPREF
57 COMMON /LOGI/ IVEL, THERM, FILER
58 COMMON /MASA/ KP, AVRG, NLIST, CONT1
59 COMMON /MAXIMA/ NPAR,ALEO,LMAX
60 COMMON /CSEED/ ISEED, TARRAY, NARRAY
61 COMMON /SYMBOL/ SITE, DIP, DIPTWO, DIPHREE, DIPPFOUR
62 COMMON /FTA/ FILE_PAR, TRAJ_XYZ
63 COMMON /LOGI/ XMD, XMC, TRAJ, FTRAJ, ARRFILE
64 COMMON /FILES/ VECT, LEER
65 COMMON // TIMESTOP, TSTART, TOTALTIME
66 COMMON /MATRIX/ LABEL, NET, ARRAY, ARRALABEL, NEIGHB, NMIN, NMAX
```

Archivo initial.f

```
1 C ***** C
2 C ** ESTA SUB-RUTINA UBICA DE MANERA ALEATORIA ** C
3 C ** LOS MONOMEROS EN LA CELDA TRIDIMENSIONAL Y ** C
4 C ** POSTERIORMENTE, CONSTRUYE LA MATRIZ DE LAS ** C
5 C ** ORIENTACIONES DE LOS CINCO DIFERENTES PUNTOS ** C
6 C ** DE CADA PROTEINA MEDIANTE REPRESENTACIONES ** C
7 C ** VECTORIALES ** C
8 C ***** C
9
10 SUBROUTINE INITIAL()
11 INCLUDE 'common_dyn.f'
12 REAL*8 COIN, COINB
13 INTEGER COMM, OFFX, OFFY, OFFZ, REPET
14 COMM = 0
15 NARRAY = 0
16 OFFX = 0
17 OFFY = 0
18 OFFZ = 0
19 REPET = 0
20 OPEN (UNIT = 8, FILE = ARRFILE, STATUS = 'OLD',ACCESS = 'APPEND')
21
22 C ***** C
23 C ** SE CONSTRUYE LA RED TRIDIMENSIONAL PARA ** C
24 C ** UBICAR CADA MONOMERO DE MANERA ALEATORIA ** C
25 C ** INICIALMENTE SE INTRODUCEN MONOMEROS DE TIPO ** C
26 C ** COMPLEJO Y EN EL TRANCURSO DE LA SIMULACION ** C
27 C ** SE INTERCAMBIAN POR MONOMEROS LIBRES ** C
28 C ***** C
29 DO I = 1, NPAR
30 LABEL(I) = 'CB2M'
31 NET(I,1) = AINT(BOX*РАНFA())
32 NET(I,2) = AINT(BOX*РАНFA())
33 NET(I,3) = AINT(BOX*РАНFA())
34 10 DO J = 1, I - 1
35 IF (J.NE.I) THEN
36 IF (NET(I,1).EQ.NET(J,1).AND.NET(I,2).EQ.NET(J,2)
37 : .AND.NET(I,3).EQ.NET(J,3)) THEN
38 COMM = 1
39 DO WHILE(COMM.EQ.1)
40 NET(I,1) = AINT(BOX*РАНFA())
41 NET(I,2) = AINT(BOX*РАНFA())
42 NET(I,3) = AINT(BOX*РАНFA())
43 GOTO 10
44 END DO
45 END IF
46 END IF
47 END DO
48 END DO
49
50 C ***** C
51 C ** AHORA SE GENERA EL CONJUNTO DE VECTORES PARA ** C
52 C ** CADA MONOMERO DE B2M: SE USAN CINCO PUNTOS ** C
53 C ** UBICADOS DE MANERA ALEATORIA ** C
54 C ***** C
55
56 TARRAY = 0
57 DO I = 1, NPAR
58 OFFX = 0
59 OFFY = 0
60 OFFZ = 0
61 DO J = 1, 5
62
63 C ***** C
64 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 1 ** C
65 C ** SIEMPRE ESTA UBICADO EN EL ORIGEN [0,0,0] ** C
66 C ***** C
67 IF (J.EQ.1) THEN
68 TARRAY = TARRAY + 1
69 NARRAY = NARRAY + 1
70 ARRALABEL(TARRAY,1) = LABEL(I)
71 ARRALABEL(TARRAY,2) = 'C1'
72 ARRAY(TARRAY,1) = I
73 ARRAY(TARRAY,2) = 0
74 ARRAY(TARRAY,3) = 0
75 ARRAY(TARRAY,4) = 0
76 END IF
77
78 C ***** C
79 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 2 ** C
80 C ***** C
81 IF (J.EQ.2) THEN
82 TARRAY = TARRAY + 1
83 NARRAY = NARRAY + 1
84 ARRALABEL(TARRAY,1) = LABEL(I)
85 ARRALABEL(TARRAY,2) = 'C2'
86 ARRAY(TARRAY,1) = I
```

```

87      COIN = RANFA()
88      IF (COIN.LE.0.3333) THEN
89
90 C ***** C
91 C **      EJE X          ** C
92 C ***** C
93      COINB = RANFB()
94      OFFX = 1
95      IF (COINB.LE.0.5) THEN
96      ARRAY(TARRAY,2) = -1
97      ARRAY(TARRAY,3) = 0
98      ARRAY(TARRAY,4) = 0
99      END IF
100     IF (COINB.GT.0.5) THEN
101     ARRAY(TARRAY,2) = 1
102     ARRAY(TARRAY,3) = 0
103     ARRAY(TARRAY,4) = 0
104     END IF
105     END IF
106     IF (COIN.GT.0.3333.AND.COIN.LE.0.6666) THEN
107
108 C ***** C
109 C **      EJE Y          ** C
110 C ***** C
111     COINB = RANFB()
112     OFFY = 1
113     IF (COINB.LE.0.5) THEN
114     ARRAY(TARRAY,2) = 0
115     ARRAY(TARRAY,3) = -1
116     ARRAY(TARRAY,4) = 0
117     END IF
118     IF (COINB.GT.0.5) THEN
119     ARRAY(TARRAY,2) = 0
120     ARRAY(TARRAY,3) = 1
121     ARRAY(TARRAY,4) = 0
122     END IF
123     END IF
124     IF (COIN.GT.0.6666) THEN
125
126 C ***** C
127 C **      EJE Z          ** C
128 C ***** C
129     COINB = RANFB()
130     OFFZ = 1
131     IF (COINB.LE.0.5) THEN
132     ARRAY(TARRAY,2) = 0
133     ARRAY(TARRAY,3) = 0
134     ARRAY(TARRAY,4) = -1
135     END IF
136     IF (COINB.GT.0.5) THEN
137     ARRAY(TARRAY,2) = 0
138     ARRAY(TARRAY,3) = 0
139     ARRAY(TARRAY,4) = 1
140     END IF
141     END IF
142     END IF
143
144 C ***** C
145 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 3 ** C
146 C ***** C
147     IF (J.EQ.3) THEN
148     TARRAY = TARRAY + 1
149     NARRAY = NARRAY + 1
150     ARRALABEL(TARRAY,1) = LABEL(I)
151     ARRALABEL(TARRAY,2) = 'C3'
152     ARRAY(TARRAY,1) = I
153
154 C ***** C
155 C ** DETERMINAR CUALES EJES PUEDE TOMAR LA PARTI- ** C
156 C ** CULA 3. USAMOS LAS VARIABLES OFFX, OFFY, OFFZ** C
157 C ***** C
158     IF (OFFX.EQ.0.AND.OFFY.EQ.0.AND.OFFZ.EQ.1) THEN
159     COIN = RANFA()
160     IF (COIN.LT.0.5) THEN
161 C ***** C
162 C **      EJE X          ** C
163 C ***** C
164     COINB = RANFB()
165     IF (COINB.LE.0.5) THEN
166     ARRAY(TARRAY,2) = -1
167     ARRAY(TARRAY,3) = 0
168     ARRAY(TARRAY,4) = 0
169     END IF
170     IF (COINB.GT.0.5) THEN
171     ARRAY(TARRAY,2) = 1
172     ARRAY(TARRAY,3) = 0
173     ARRAY(TARRAY,4) = 0
174     END IF
175     END IF
176     IF (COIN.GE.0.5) THEN
177 C ***** C
178 C **      EJE Y          ** C
179 C ***** C
180     COINB = RANFB()
181     IF (COINB.LE.0.5) THEN
182     ARRAY(TARRAY,2) = 0
183     ARRAY(TARRAY,3) = -1
184     ARRAY(TARRAY,4) = 0
185     END IF
186     IF (COINB.GT.0.5) THEN
187     ARRAY(TARRAY,2) = 0
188     ARRAY(TARRAY,3) = 1
189     ARRAY(TARRAY,4) = 0
190     END IF
191     END IF
192     END IF
193
194     IF (OFFX.EQ.0.AND.OFFY.EQ.1.AND.OFFZ.EQ.0) THEN
195     COIN = RANFA()
196     IF (COIN.LT.0.5) THEN
197 C ***** C
198 C **      EJE X          ** C
199 C ***** C
200     COINB = RANFB()
201     IF (COINB.LE.0.5) THEN
202     ARRAY(TARRAY,2) = -1
203     ARRAY(TARRAY,3) = 0
204     ARRAY(TARRAY,4) = 0
205     END IF
206     IF (COINB.GT.0.5) THEN
207     ARRAY(TARRAY,2) = 1
208     ARRAY(TARRAY,3) = 0
209     ARRAY(TARRAY,4) = 0
210     END IF
211     END IF
212     IF (COIN.GE.0.5) THEN
213 C ***** C
214 C **      EJE Z          ** C
215 C ***** C
216     COINB = RANFB()
217     IF (COINB.LE.0.5) THEN
218     ARRAY(TARRAY,2) = 0
219     ARRAY(TARRAY,3) = 0
220     ARRAY(TARRAY,4) = -1
221     END IF
222     IF (COINB.GT.0.5) THEN
223     ARRAY(TARRAY,2) = 0
224     ARRAY(TARRAY,3) = 0
225     ARRAY(TARRAY,4) = 1
226     END IF
227     END IF
228     END IF
229
230     IF (OFFX.EQ.1.AND.OFFY.EQ.0.AND.OFFZ.EQ.0) THEN
231     COIN = RANFA()
232     IF (COIN.LT.0.5) THEN
233 C ***** C
234 C **      EJE Y          ** C
235 C ***** C
236     COINB = RANFB()
237     IF (COINB.LE.0.5) THEN
238     ARRAY(TARRAY,2) = 0
239     ARRAY(TARRAY,3) = -1
240     ARRAY(TARRAY,4) = 0
241     END IF
242     IF (COINB.GT.0.5) THEN
243     ARRAY(TARRAY,2) = 0
244     ARRAY(TARRAY,3) = 1
245     ARRAY(TARRAY,4) = 0
246     END IF
247     END IF
248     IF (COIN.GE.0.5) THEN
249 C ***** C
250 C **      EJE Z          ** C
251 C ***** C
252     COINB = RANFB()
253     IF (COINB.LE.0.5) THEN
254     ARRAY(TARRAY,2) = 0
255     ARRAY(TARRAY,3) = 0
256     ARRAY(TARRAY,4) = -1
257     END IF
258     IF (COINB.GT.0.5) THEN
259     ARRAY(TARRAY,2) = 0
260     ARRAY(TARRAY,3) = 0
261     ARRAY(TARRAY,4) = 1
262     END IF
263     END IF
264     END IF
265     END IF
266
267 C ***** C
268 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 4 ** C
269 C ***** C
270     IF (J.EQ.4) THEN

```

```

271      TARRAY = TARRAY + 1
272      NARRAY = NARRAY + 1
273      ARRALABEL(TARRAY,1) = LABEL(I)
274      ARRALABEL(TARRAY,2) = 'C4'
275      ARRAY(TARRAY,1) = I
276      ARRAY(TARRAY,2) = -1 * ARRAY(TARRAY - 2 ,2)
277      ARRAY(TARRAY,3) = -1 * ARRAY(TARRAY - 2 ,3)
278      ARRAY(TARRAY,4) = -1 * ARRAY(TARRAY - 2 ,4)
279      END IF
280
281 C ***** C
282 C ** OPERACIONES SOBRE LA PARTICULA 5 ** C
283 C ***** C
284      IF (J.EQ.5) THEN
285          TARRAY = TARRAY + 1
286          NARRAY = NARRAY + 1
287          ARRALABEL(TARRAY,1) = LABEL(I)
288          ARRALABEL(TARRAY,2) = 'C5'
289          ARRAY(TARRAY,1) = I
290          ARRAY(TARRAY,2) = -1 * ARRAY(TARRAY - 2 ,2)
291          ARRAY(TARRAY,3) = -1 * ARRAY(TARRAY - 2 ,3)
292          ARRAY(TARRAY,4) = -1 * ARRAY(TARRAY - 2 ,4)
293          END IF
294          END DO
295          END DO
296
297 C ***** C
298 C ** IMPRIME LA INFORMACION DE CADA VECTOR ** C
299 C ***** C
300      WRITE(8,*) 'STEP: ', '0'
301      DO I = 1, TARRAY
302          WRITE(8,*) ARRALABEL(I,1), ARRALABEL(I,2),
303          : ARRAY(I,1), ARRAY(I,2), ARRAY(I,3), ARRAY(I,4)
304      END DO
305      WRITE(8,*)
306      CLOSE(8)
307 C      WRITE(8,*) NARRAY
308      END SUBROUTINE

```

Archivo initread.f

```

1 C ***** C
2 C ** ESTA SUB-RUTINA LEE EL ARCHIVO DE ENTRADA ** C
3 C ** CON EXTENSION *.INP ** C
4 C ***** C
5      SUBROUTINE INITREAD()
6      INCLUDE 'common_dyn.f'
7      INTEGER NUMARG, J, COMM
8
9      NUMARG = IARGC()
10     ACONT = 0
11     DO I = 1, NUMARG
12         CALL GETARG (I, ARG)
13         VECT(I) = ARG
14     ENDDO
15     IF (NUMARG.LT.2.OR.NUMARG.GT.2) THEN
16         WRITE(*,*) 'Invalid arguments'
17         STOP
18     ENDIF
19     PRESENT = .FALSE.
20     INQUIRE (FILE = VECT(1), EXIST = PRESENT)
21     IF (.NOT. PRESENT) THEN
22         WRITE(*,')('Don''t exist the file'',2X,A10)') VECT(1)
23     STOP
24     RETURN
25     ENDIF
26     OPEN(UNIT=1,FILE=VECT(1))
27     OPEN(UNIT=2,FILE=VECT(2),STATUS='REPLACE')
28     CALL PTIME(0)
29
30     WRITE (2,1005) '***','Input File ==>',VECT(1),'**'
31     WRITE (2,1005) '***','Output File ==>', VECT(2),'**'
32 1005   FORMAT(1X,A2,20X,A20,2X,A14,20X,A2)
33     CALL ENVIR()
34
35     WRITE(2,1001)'==','>>>>>> READING SIMULATION INFORMATION <<<<<<'
36     &,'==''
37     WRITE(2,*)('=', I = 1, 80)
38 1001   FORMAT (1X,A2,15X,A,15X,A)
39
40     DO 10 I=1,LINES
41         READ (1,*, END=99) DIP(I),DIPTWO(I),DIPTHREE(I)
42         IF (DIP(I).EQ.'!''.OR.DIP(I).EQ.'') THEN
43             GOTO 10
44         END IF
45         ACONT = ACONT + 1
46 10     CONTINUE
47 99     CONTINUE
48
49 C ***** C
50 C ** VERIFICA EL ESTADO DE TODOS LOS COMANDOS ** C
51 C ***** C
52     DO I = 1, ACONT
53         READCOMM = .FALSE.
54         DO J = 1,10
55             IF (DIP(I).EQ.COMMANDS(J)) THEN
56                 READCOMM = .TRUE.
57             END IF
58         END DO
59         IF (.NOT. READCOMM) THEN
60             CALL ERROR(4)
61         END IF
62     END DO
63     RETURN
64     CLOSE(2)
65     END SUBROUTINE

```

Archivo readpars.f

```

1 C ***** C
2 C ** ESTA SUB-RUTINA LEE TODOS LOS PARAMETROS ** C
3 C ** LEIDOS EN INITREAD Y LOS ASIGNA A LAS DIFE- ** C
4 C ** RENTES VARIABLES DECLARADAS. ** C
5 C ***** C
6
7      SUBROUTINE READPARS(TFILE)
8      INCLUDE 'common_dyn.f'
9      INTEGER COMM
10     CHARACTER*100 ARCH
11     COMM = 0
12     CONTE = 0
13
14     OPEN(UNIT=2,FILE=VECT(2), STATUS = 'OLD', ACCESS = 'APPEND')
15     DO I = 1, ACONT
16         IF (DIP(I).EQ.'FILE_PAR') THEN
17             READ (DIPTHREE(I), '(A40)', IOSTAT = ERRSTAT), FILE_PAR
18             WRITE(2,'(1X,','***',6X,'PARAMETER FILE: ',5X,A15,34X,'***')')
19             : FILE_PAR
20             IF (ERRSTAT.NE.0) THEN
21                 COMM = 1
22                 CALL ERROR(2)
23             END IF
24             PRESENT = .FALSE.
25             INQUIRE (FILE = FILE_PAR, EXIST = PRESENT)
26             IF (.NOT. PRESENT) THEN
27                 WRITE(2,'(1X,','***',6X,'FILE: ',10X,A40,9X,'***')')
28                 STOP
29             RETURN
30             ENDIF
31             END IF
32
33             IF (DIP(I).EQ.'FILE_ARRAY') THEN
34                 READ(DIPTHREE(I),'(A20)',IOSTAT = ERRSTAT), ARRFILE
35                 WRITE(2,'(1X,','***',6X,'ARRAY FILE: ',10X,A40,9X,'***')')
36                 : ARRFILE
37                 IF (ERRSTAT.NE.0) THEN
38                     CALL ERROR(15)
39                 END IF
40             END IF
41
42             IF (DIP(I).EQ.'FILE_TRAJ') THEN

```

```

43      READ (DIPTHREE(I), '(A20)', IOSTAT = ERRSTAT), FTRAJ      91
44      WRITE(2,'(1X,'**',6X,'TRAJECTORY FILE:',5X,A40,9X,'**')') 92
45      : DIPTHREE(I)      93
46      IF (ERRSTAT.NE.0) THEN      94
47      CALL ERROR(15)      95
48      COMM = 1      96
49      END IF      97
50      END IF      98
51      99
52      IF (DIP(I).EQ.'NSTEP') THEN      100
53      READ (DIPTHREE(I), '(I10)', IOSTAT = ERRSTAT), NSTEP      101
54      WRITE(2,'(1X,'**',6X,'STEPS:',15X,A10,39X,'**')')      102
55      : DIPTHREE(I)      103
56      IF (ERRSTAT.NE.0) THEN      104
57      CALL ERROR(8)      105
58      COMM = 1      106
59      END IF      107
60      END IF      108
61      109
62      IF (DIP(I).EQ.'PRINT_STEP') THEN      110
63      READ (DIPTHREE(I), '(I12)', IOSTAT = ERRSTAT), TIMEP      111
64      IF (ERRSTAT.NE.0) THEN      112
65      CALL ERROR(10)      113
66      COMM = 1      114
67      END IF      115
68      END IF      116
69      117
70      IF (DIP(I).EQ.'VEL_SEED') THEN      118
71      READ (DIPTHREE(I), '(I10)', IOSTAT = ERRSTAT), ISEED      119
72      ISEED = ISEED * INT(TIME())      120
73      WRITE(2,'(1X,'**',6X,'RANDOM NUMBER:',7X,A7,42X,'**')')      121
74      : DIPTHREE(I)      122
75      123
76      IF (ERRSTAT.NE.0) THEN      124
77      CALL ERROR(16)      125
78      COMM = 1      126
79      END IF      127
80      END IF      128
81      129
82      IF (DIP(I).EQ.'TEMP_REF') THEN      130
83      READ (DIPTHREE(I), '(F12.2)', IOSTAT = ERRSTAT), TEMPREF      131
84      WRITE(2,'(1X,'**',6X,'TEMPERATURE (K):',5X,A6,43X,'**')')      132
85      : DIPTHREE(I)      133
86      IF (ERRSTAT.NE.0) THEN      134
87      CALL ERROR(13)      135
88      COMM = 1      136
89      END IF      137
90      END IF      138

```

Archivo average.f

```

1 C ***** C
2 C ** ESTA SUB-RUTINA CALCULA EL TAMANO PROMEDIO ** C
3 C ** DE LAS ASOCIACIONES DE PROTEINAS CADA ** C
4 C ** TSTEP DE LA SIMULACION ** C
5 C ***** C
6
7      SUBROUTINE AVERAGE()
8      INCLUDE 'common_dyn.f'
9      INTEGER VAL1, VAL2, TMONOA, MAXIM
10     INTEGER ETIQ, ETIQ2, J, TOMN, CONT2, CHARLEN, COMM2, COLA(LINES)
11     INTEGER FCOLA(LINES), CONT3, COMM3, SUMB, SUMA, COMM4, MOMA
12     REAL*8 TMONOB
13     TMONOA = 0
14     TMONOB = 0
15     CONT1 = 0
16     TOMN = 0
17     ETIQ = 1
18     NMAX = 0
19     NMIN = 10
20
21     IF (TOTALN.GT.0) THEN
22     DO I = 1, TOTALN
23     VAL1 = NEIGHB(I,1)
24     VAL2 = NEIGHB(I,2)
25     TOMN = 0
26     IF (CONT1.GT.0) THEN
27     DO L = 1, CONT1
28     IF (VAL1.EQ.NLIST(L,1).AND.VAL2.EQ.NLIST(L,2)) THEN
29     TOMN = 1
30     END IF
31     END DO
32     IF (TOMN.EQ.0) THEN
33     CONT1 = CONT1 + 1
34     ETIQ = ETIQ + 1
35     NLIST(CONT1,1) = VAL1
36     NLIST(CONT1,2) = VAL2
37     NLIST(CONT1,3) = ETIQ
38     END IF
39     END IF
40
41     IF (CONT1.EQ.0) THEN
42     CONT1 = CONT1 + 1
43     NLIST(CONT1,1) = VAL1
44     NLIST(CONT1,2) = VAL2
45     NLIST(CONT1,3) = ETIQ
46     END IF
47 C
48     IF (TOMN.NE.1) THEN
49     DO J = I + 1, TOTALN
50     IF (VAL1.EQ.NEIGHB(J,1).OR.VAL1.EQ.NEIGHB(J,2).OR.
51     : VAL2.EQ.NEIGHB(J,1).OR.VAL2.EQ.NEIGHB(J,2)) THEN
52     MOMA = 0
53     DO K = 1, CONT1
54     IF (NEIGHB(J,1).EQ.NLIST(K,1).AND.
55     : NEIGHB(J,2).EQ.NLIST(K,2)) THEN
56     MOMA = 1
57     END IF
58     END DO
59     IF (MOMA.EQ.0) THEN
60     CONT1 = CONT1 + 1
61     NLIST(CONT1,1) = NEIGHB(J,1)
62     NLIST(CONT1,2) = NEIGHB(J,2)
63     NLIST(CONT1,3) = ETIQ
64     END IF
65     END IF
66     END DO
67     END IF
68     END DO
69
70     DO 777 I = CONT1, 2, -1

```

```

71      DO J = 1, I - 1
72      IF (NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,1).OR.
73      :   NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,2).OR.
74      :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,1).OR.
75      :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,2)) THEN
76      NLIST(I,3) = NLIST(J,3)
77      GO TO 777
78      END IF
79      END DO
80 777  CONTINUE
81
82      DO 778 I = 1, CONT1 - 1
83      DO J = CONT1, I + 1, -1
84      IF (NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,1).OR.
85      :   NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,2).OR.
86      :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,1).OR.
87      :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,2)) THEN
88      NLIST(I,3) = NLIST(J,3)
89      GO TO 778
90      END IF
91      END DO
92 778  CONTINUE
93
94      DO 779 I = 1, CONT1 - 1
95      DO J = CONT1, I + 1, -1
96      IF (NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,1).OR.
97      :   NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,2).OR.
98      :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,1).OR.
99      :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,2)) THEN
100     NLIST(I,3) = NLIST(J,3)
101     GO TO 779
102     END IF
103     END DO
104 779  CONTINUE
105
106     DO 780 I = CONT1, 2, -1
107     DO J = 1, I - 1
108     IF (NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,1).OR.
109     :   NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,2).OR.
110     :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,1).OR.
111     :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,2)) THEN
112     NLIST(I,3) = NLIST(J,3)
113     GO TO 780
114     END IF
115     END DO
116 780  CONTINUE
117
118     SUMA = 0
119     SUMB = 0
120     DO 781 I = 1, ETIQ
121     CONT2 = 0
122     COMM3 = 0
123     COMM4 = 1
124     DO J = 1, CONT1
125     IF (I.EQ.NLIST(J,3)) THEN
126     COMM3 = 1
127     COMM4 = 0
128     CONT2 = CONT2 + 1
129     COLA(CONT2) = NLIST(J,1)
130     CONT2 = CONT2 + 1
131     COLA(CONT2) = NLIST(J,2)
132     END IF
133     END DO
134
135     IF (COMM4.EQ.0) THEN
136     SUMB = SUMB + 1
137     END IF
138     IF (CONT2.GT.0) THEN
139     CONT3 = 0
140     DO 800 L = 1, CONT2
141     IF (CONT3.GT.0) THEN
142     COMM3 = 0
143     DO K = 1, CONT3
144     IF (COLA(L).EQ.FCOLA(K)) THEN
145     COMM3 = 1
146     END IF
147     END DO
148     IF (COMM3.EQ.0) THEN
149     CONT3 = CONT3 + 1
150     SUMA = SUMA + 1
151     FCOLA(CONT3) = COLA(L)
152     END IF
153     END IF
154
155     IF (CONT3.EQ.0) THEN
156     CONT3 = CONT3 + 1
157     SUMA = SUMA + 1
158     FCOLA(CONT3) = COLA(L)
159     END IF
160
161 800  CONTINUE
162     IF (CONT3.GT.NMAX) THEN
163     NMAX = CONT3
164     END IF
165     IF (CONT3.LE.NMIN) THEN
166     NMIN = CONT3
167     END IF
168     END IF
169
170 781  CONTINUE
171     AVRG = DBLE(SUMA) / DBLE(SUMB)
172     ELSE
173     AVRG = 0.0D0
174     NMIN = 0
175     NMAX = 0
176     END IF
177
178     DO I = 1, CONT1
179     DO J = I + 1, CONT1
180     IF (NLIST(I,1).EQ.NLIST(J,1).AND.
181     :   NLIST(I,2).EQ.NLIST(J,2)) THEN
182     WRITE(*,*) 'REPITE'
183     END IF
184     END DO
185     END DO
186     END SUBROUTINE

```

Archivo error.f

```

1 C ***** C
2 C ** SUB-ROUTINA DE TODOS LOS POSIBLES ERROES QUE ** C
3 C ** SE PUEDEN PRESENTAR DURANTE LA EJECUCION DEL ** C
4 C ** PROGRAMA ** C
5 C ***** C
6
7     SUBROUTINE ERROR(ERRMSG)
8     INTEGER ERRMSG
9     IF (ERRMSG.EQ.1) THEN
10     WRITE(*,*) 'It is''t a integer number'
11     STOP
12     END IF
13
14     IF (ERRMSG.EQ.2) THEN
15     WRITE(*,*) 'The isn''t a character'
16     STOP
17     END IF
18
19     IF (ERRMSG.EQ.3) THEN
20     WRITE(*,*) 'Error during coordinates file read'
21     STOP
22     END IF
23
24     IF (ERRMSG.EQ.4) THEN
25     WRITE(*,*) 'Error during commands lecture'
26     STOP
27     END IF
28
29     IF (ERRMSG.EQ.5) THEN
30     WRITE(*,*) 'The variable is not Double'
31     STOP
32     END IF
33
34     IF (ERRMSG.EQ.6) THEN
35     WRITE(*,*) 'Thermostate error'
36     STOP
37     END IF
38
39     IF (ERRMSG.EQ.7) THEN
40     WRITE(*,*) 'Model error'
41     STOP
42     END IF
43
44     IF (ERRMSG.EQ.8) THEN
45     WRITE(*,*) 'Nstep error'
46     STOP
47     END IF
48
49     IF (ERRMSG.EQ.9) THEN
50     WRITE(*,*) 'Time_step error'

```

```

51      STOP
52      END IF
53
54      IF (ERRMSG.EQ.10) THEN
55        WRITE(*,*) 'Print step error'
56      STOP
57      END IF
58
59      IF (ERRMSG.EQ.11) THEN
60        WRITE(*,*) 'Init_veloc error'
61      STOP
62      END IF
63
64      IF (ERRMSG.EQ.12) THEN
65        WRITE(*,*) 'Thermostate error'
66      STOP
67      END IF
68
69      IF (ERRMSG.EQ.13) THEN
70        WRITE(*,*) 'Temp_ref error'
71      STOP
72      END IF
73
74      IF (ERRMSG.EQ.14) THEN
75        WRITE(*,*) 'Traj_xyz error'
76      STOP
77      END IF

```

```

78
79      IF (ERRMSG.EQ.15) THEN
80        WRITE(*,*) 'File_traj error'
81      STOP
82      END IF
83
84      IF (ERRMSG.EQ.16) THEN
85        WRITE(*,*) 'Vel_seed error'
86      STOP
87      END IF
88
89      IF (ERRMSG.EQ.17) THEN
90        WRITE(*,*) 'Temp_veloc_inic error'
91      STOP
92      END IF
93
94      IF (ERRMSG.EQ.18) THEN
95        WRITE(*,*) 'Coordinates error lecture'
96      STOP
97      END IF
98
99      IF (ERRMSG.EQ.19) THEN
100       WRITE(*,*) 'Problems with particle number'
101      STOP
102      END IF
103      END

```

Archivo ramdon_par.f

```

1 C ***** C
2 C ** LISTADO DE FUNCIONES ALEATORIAS ** C
3 C ***** C
4 C FUNCION PARA METROPOLIS ---> ENERGIA Pa - Pb ** C
5 C ***** C
6      FUNCTION RANF()
7      DATA IA/16807/,IC/2147483647/,IQ/127773/,IR/2836/
8      INCLUDE 'common_dyn.f'
9      IH = ISEED/IQ
10     IL = MOD(ISEED,IQ)
11     IT = IA*IL-IR*IH
12     IF(IT.GT.0) THEN
13       ISEED = IT
14     ELSE
15       ISEED = IC+IT
16     END IF
17     RANF = ISEED/FLOAT(IC)
18     RETURN
19     END
20
21 C ***** C
22 C FUNCION PARA MATRIZ DE MONOMEROS EN LA RED ** C
23 C ***** C
24     FUNCTION RANFA()
25     DATA IA/16807/,IC/2147483647/,IQ/127773/,IR/2836/
26     INCLUDE 'common_dyn.f'
27     IH = ISEED/IQ
28     IL = MOD(ISEED,IQ)
29     IT = IA*IL-IR*IH
30     IF(IT.GT.0) THEN
31       ISEED = IT
32     ELSE
33       ISEED = IC+IT
34     END IF
35     RANFA = ISEED/FLOAT(IC)
36     RETURN
37     END
38
39 C ***** C
40 C FUNCION PARA MATRIZ DE VECTORES DE CADA MONOMERO** C
41 C ***** C
42     FUNCTION RANFB()
43     DATA IA/16807/,IC/2147483647/,IQ/127773/,IR/2836/
44     INCLUDE 'common_dyn.f'
45     IH = ISEED/IQ
46     IL = MOD(ISEED,IQ)
47     IT = IA*IL-IR*IH
48     IF(IT.GT.0) THEN
49       ISEED = IT
50     ELSE
51       ISEED = IC+IT
52     END IF
53     RANFB = ISEED/FLOAT(IC)
54     RETURN
55     END
56

```

```

57 C ***** C
58 C      FUNCION PARA POSICION/ORIENTACION ** C
59 C ***** C
60     FUNCTION RANFC()
61     DATA IA/16807/,IC/2147483647/,IQ/127773/,IR/2836/
62     INCLUDE 'common_dyn.f'
63     IH = ISEED/IQ
64     IL = MOD(ISEED,IQ)
65     IT = IA*IL-IR*IH
66     IF(IT.GT.0) THEN
67       ISEED = IT
68     ELSE
69       ISEED = IC+IT
70     END IF
71     RANFC = ISEED/FLOAT(IC)
72     RETURN
73     END
74
75 C ***** C
76 C **      FUNCION PARA ORIENTACION ** C
77 C ***** C
78     FUNCTION RANFD()
79     DATA IA/16807/,IC/2147483647/,IQ/127773/,IR/2836/
80     INCLUDE 'common_dyn.f'
81     IH = ISEED/IQ
82     IL = MOD(ISEED,IQ)
83     IT = IA*IL-IR*IH
84     IF(IT.GT.0) THEN
85       ISEED = IT
86     ELSE
87       ISEED = IC+IT
88     END IF
89     RANFD = ISEED/FLOAT(IC)
90     RETURN
91     END
92
93 C ***** C
94 C **      FUNCION PARA DESPLAZAR UN MONOMERO O TODOS ** C
95 C **      SUS VECINOS ** C
96 C ***** C
97     FUNCTION RANFE()
98     DATA IA/16807/,IC/2147483647/,IQ/127773/,IR/2836/
99     INCLUDE 'common_dyn.f'
100    IH = ISEED/IQ
101    IL = MOD(ISEED,IQ)
102    IT = IA*IL-IR*IH
103    IF(IT.GT.0) THEN
104      ISEED = IT
105    ELSE
106      ISEED = IC+IT
107    END IF
108    RANFE = ISEED/FLOAT(IC)
109    RETURN
110    END
111

```

Archivo hostname.f

```
1 SUBROUTINE ENVIR()
2 INCLUDE 'common_dyn.f'
3 CHARACTER*124 NAME, PATH, LOGUSER
4 INTEGER STATUS, PID, GETPID
5 CALL HostNm(NAME, STATUS)
6 CALL GETCWD(PATH)
7 CALL GETLOG(LOGUSER)
8 PID = GETPID()
9 OPEN(UNIT=2,FILE=VECT(2))
11 WRITE(2,1000) '***','Hostname ==> ',NAME,'***'
12 WRITE(2,1000) '***','Username ==> ',LOGUSER,'***'
13 WRITE(2,1001) '***','Process ID ==> ',PID,'***'
14 WRITE(2,1002) '***','FOLDER PATH:',PATH,'***'
15 WRITE(2,1003) '***',PATH,'***'
16 WRITE(2,*)('=', I = 1, 80)
17
18 1000 FORMAT(1X,A2,25X,A16,1X,A20,14X,A2)
19 1001 FORMAT(1X,A2,23X,A18,1X,I5,29X,A2)
20 1002 FORMAT(1X,A2,30X,A12,34X,A2)
21 1003 FORMAT(1X,A2,1X,A74,1X,A2)
22 END SUBROUTINE
```

Archivo system.f

```
1 CHARACTER*24 FUNCTION FDATE()
2 INTEGER DATE_TIME (8)
3 CHARACTER (LEN = 12) REAL_CLOCK (3)
4 INTEGER CURRDATE
5 CHARACTER*80 STRING
6
7 CALL DATE_AND_TIME(REAL_CLOCK(1),STRING,
8 & REAL_CLOCK(3),DATE_TIME)
9
10 FDATE=STRING(1:24)
11
12 RETURN
13 END
```

Archivo itime.f

```
1 SUBROUTINE PTIME(IOP)
2 INCLUDE 'common_dyn.f'
3 INTEGER IOP
4 IF (IOP.EQ.0) THEN
5 TSTART = CPUTIME()
6 OPEN (UNIT = 2, FILE = VECT(2),STATUS='OLD',ACCESS='APPEND')
7 WRITE(2,*) ('=', I = 1, 80)
8 WRITE(2,100) '***','VERSION 1.0', '***'
9 WRITE(2,101) '***','AMYLOID SOFTWARE FOR B2-MICROGLOBULINE', '***'
10 WRITE(2,*) ('*', I = 1, 80)
11 WRITE(2,102) '***','This CODE was performed to illustrate how the',
12 : 'b2-microglobulin can be', '***'
13 WRITE(2,103) '***','able to form fibrils. Each routine included',
14 : 'in this program were only', '***'
15 WRITE(2,104) '***','designed for this type of proteins. But, it',
16 : 'could be employed to other', '***'
17 WRITE(2,105) '***','similar situations.', '***'
18 WRITE(2,*) ('*', I = 1, 80)
19 WRITE(2,106) '***','This software was developed by: JORGE RICARDO',
20 : 'QUINTERO S. to obtain a', '***'
21 WRITE(2,107) '***','master degree in Chemistry at Universidad',
22 : 'Industrial de Santander, COL', '***'
23 WRITE(2,108) '***','Adviser: CRISTIAN BLANCO TIRADO, Ph.D.', '***'
24 WRITE(2,*) ('*', I = 1, 80)
25 WRITE(2,15) '***', '***'
26 WRITE(2,14) '***','WWW:http://ciencias.uis.edu.co/~jorge_quintero',
27 &'***'
28 WRITE(2,15) '***', '***'
29 WRITE(2,*) ('=', I = 1, 80)
30 WRITE(2,6) '***', '***'
31 WRITE (2,5) '*****','STARTED AT: ',FDATE(), '*****'
32 WRITE(2,6) '***', '***'
33 WRITE(2,*) ('=', I = 1, 80)
34 END IF
35
36 IF (IOP.EQ.1) THEN
37 WRITE(2,21) '***',' Normal Termination for Simulation',
38 &'***'
39 WRITE (2,1000) '*****',' ENDED ON: ',FDATE(), '*****'
40
41 TIMESTOP = CPUTIME()
42 TOTALTIME = TIMESTOP - TSTART
43 INTTIME = INT ( TOTALTIME )
44 HOURS = INTTIME / 3600
45 MINUTES = ( INTTIME - HOURS * 3600 ) / 60
46 SECONDS = TOTALTIME - DFLOAT ( HOURS * 3600 + MINUTES * 60 )
47 WRITE(2,*) '***', ('-', I = 1, 74), '***'
48 WRITE(2,*) '***', 'Hours: ',HOURS,'***'
49 WRITE(2,*) '***', 'Minutes: ',MINUTES,'***'
50 WRITE(2,*) '***', 'Seconds: ',SECONDS,'***'
51 WRITE(2,*) '***', ('-', I = 1, 74), '***'
52 END IF
53 5 FORMAT(1x,A7,12X,A15,1X,A24,14x,A7)
54 6 FORMAT(1X,A2,76X,A2)
55 14 FORMAT (1X,A,14X,A,15X,A)
56 15 FORMAT (1X,A,76X,A)
57 21 FORMAT (1X,A,21X,A,20x,A)
58 100 FORMAT (1X,A2,34X,A11,31X,A2)
59 101 FORMAT (1X,A2,19X,A38,19X,A2)
60 102 FORMAT (1X,A2,1X,A45,1X,A23,6X,A2)
61 103 FORMAT (1X,A2,1X,A44,1X,A25,5X,A2)
62 104 FORMAT (1X,A2,1X,A44,1X,A26,4X,A2)
63 105 FORMAT (1X,A2,1X,A19,56X,A2)
64 106 FORMAT (1X,A2,1X,A45,1X,A23,6X,A2)
65 107 FORMAT (1X,A2,1X,A41,1X,A28,5X,A2)
66 108 FORMAT (1X,A2,1X,A38,37X,A2)
67 999 FORMAT (1X,A2,1X,74(A1),1X,A2)
68 1001 FORMAT (1X,A2,22X,A10,3X,F4.1,37X,A2)
69 1002 FORMAT (1X,A2,22X,A10,2X,I5,37X,A2)
70 1000 FORMAT (1x,A7,12X,A15,1X,A24,14x,A7)
71 1004 FORMAT (1X,A2,1X,A74,1X,A2)
72 END SUBROUTINE
```

Archivo time.f

```
1 REAL*8 FUNCTION CPUTIME()
2 IMPLICIT CHARACTER*99 (A-Z)
3 REAL TARRAY(2) , ETIME
4 CPUTIME = DBLE ( ETIME ( TARRAY ) )
5 RETURN
6 END
7
8 REAL*8 FUNCTION STIME()
9 IMPLICIT CHARACTER*99 (A-Z)
10 REAL TY(2), ETIME
11 STIME = DBLE ( ETIME ( TY ) )
12 RETURN
13 END
```

Archivo Makefile

```
1 #####
2 ## ARCHIVO MAKEFILE PARA EL GENERAR EL EJECUTABLE Gising.exe ##
3 ## LA COMPILACION SE REALIZA DE LA SIGUIENTE MANERA: ##
4 ## make ##
5 #####
6 GCC = gfortran
7 CFLAGS = -c
8 LDFLAGS =
9
10 SOURCES = ising.o main.o error.o hostname.o initread.o \
11          randon_par.o readpars.o system.o time.o itime.o initial.o \
12          energy.o neighbors.o average.o
13
14 OBJECTS = $(SOURCES:.f=.o)
15 EXECUTABLE = Gising.exe
16
17 all: $(SOURCES) $(EXECUTABLE)
18 $(EXECUTABLE): $(OBJECTS)
19 $(GCC) $(LDFLAGS) $(OBJECTS) -o $@
20 rm -rf *.o
21
22 .f.o:
23 $(GCC) $(CFLAGS) $< -o $@
24
25 clean:
26 rm -rf *.o Gising.exe
```

Archivo de entrada input.inp

```
1 TITLE = 'Amyloid simulation' ! Título
2 FILE_PAR = param.dat listo ! parámetros de energía
3 FILE_TRAJ = traj_200.xyz ! archivo de trayectorias
4 FILE_ARRAY = traj_200.arr ! archivo de vectores
5 NSTEP = 5000000 ! Número de pasos de la simulación
6 PRINT_STEP = 1000 ! frecuencia de impresión de datos
7 VEL_SEED = 1 ! número aleatorio
8 TEMP_REF = 310.0 ! temperatura (K)
9 DIM = 50 ! dimensiones de la red (Lx Ly Lz)
10 NPAR = 200 ! cantidad de monómeros
```

Anexo 2. Perfiles de energía de las interacciones entre pares de monómeros $\beta 2m$ para todos los contactos

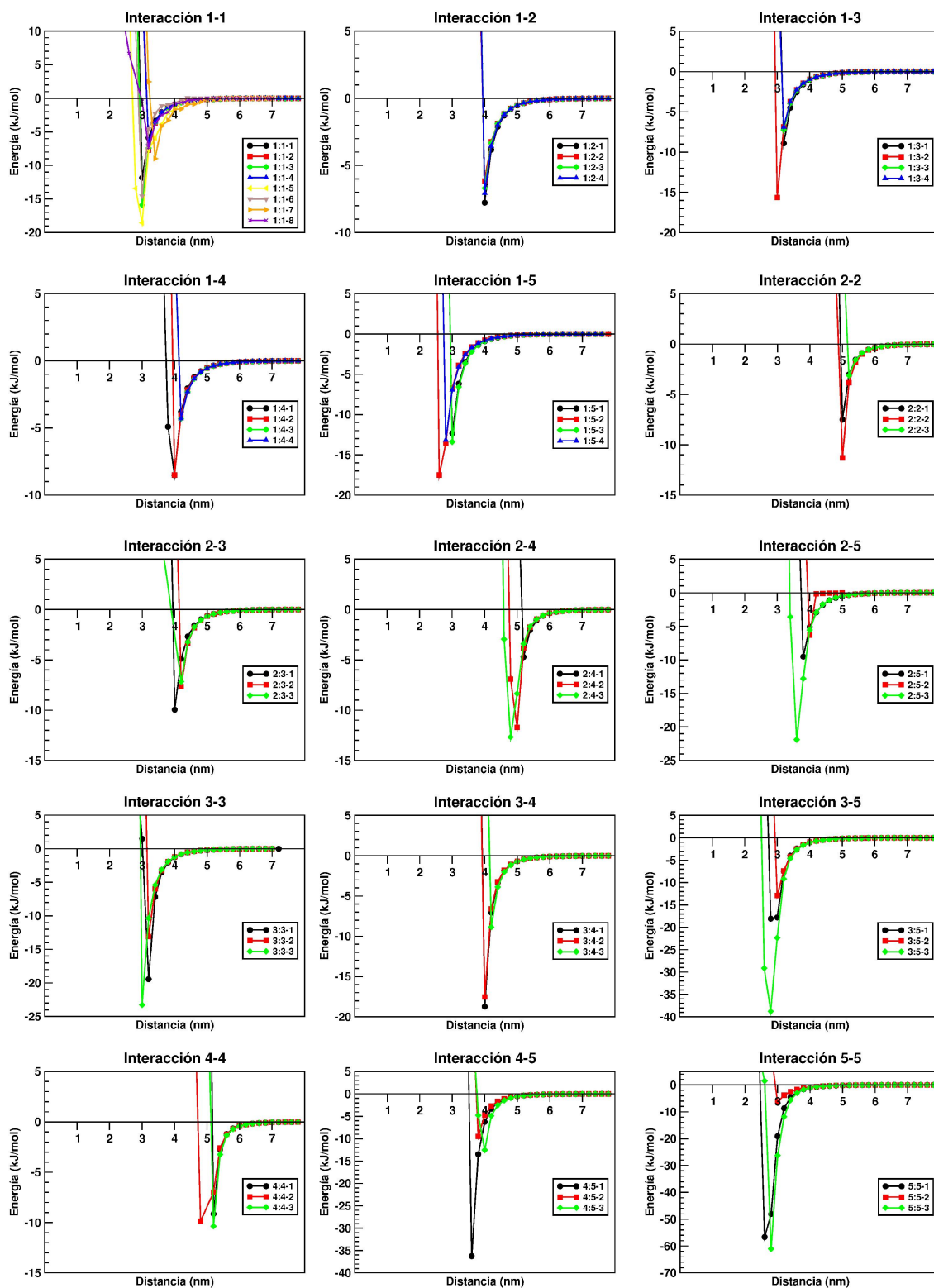


Figura 45. Perfiles de energía de las interacciones $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$.

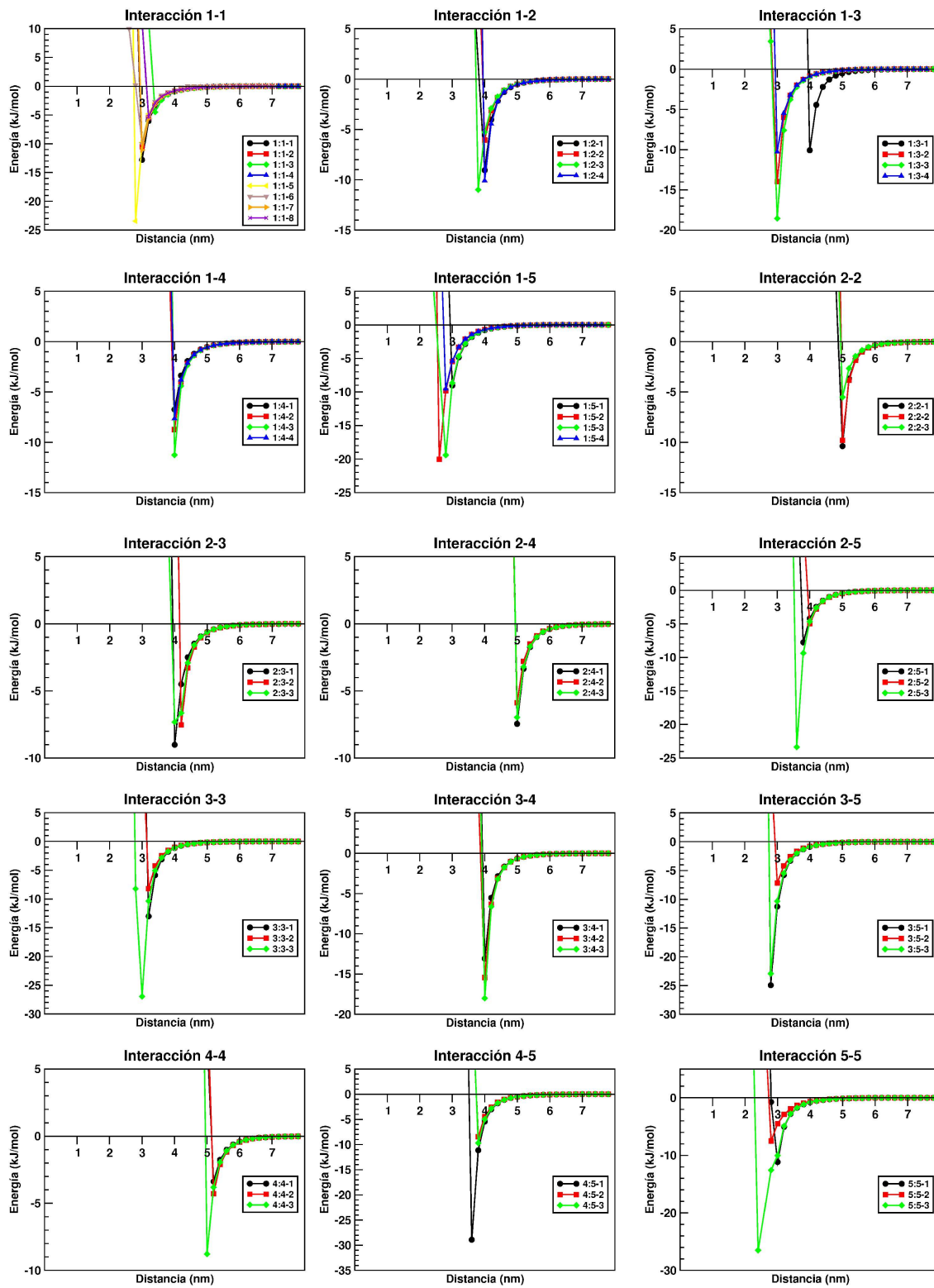


Figura 46. Perfiles de energía de las interacciones $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$.

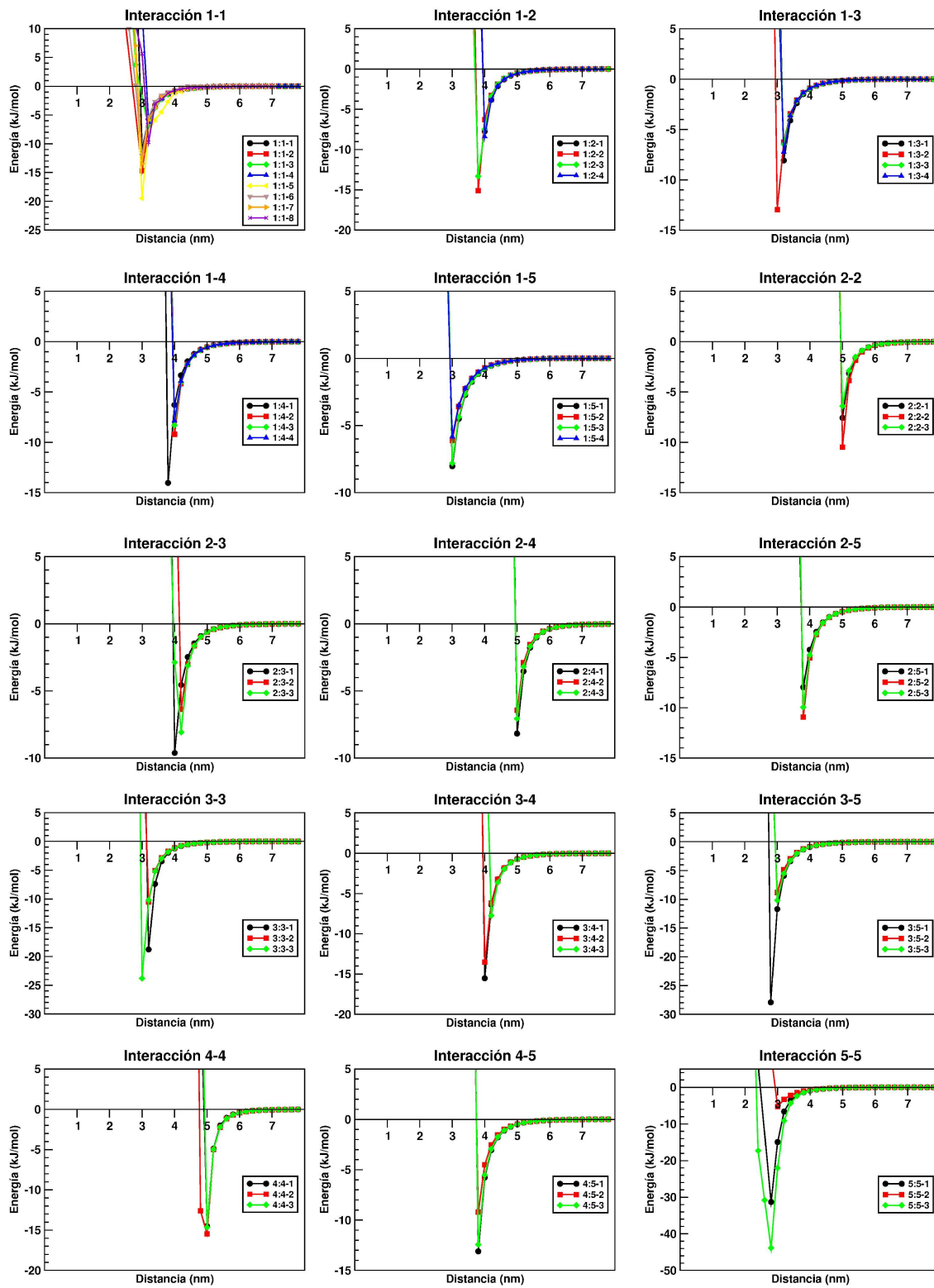


Figura 47. Perfiles de energía de las interacciones $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_C$.

Anexo 3. Parámetros de energías para las simulaciones

Conectado	#	E (kJ/mol)	Configuraciones		
			Puntos	Ángulo _{ij}	Ángulo _{ji}
F1:F1	1	-11.852	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
			3-1-1-3	0.00	0.00
	2	-7.697	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	3	-15.898	2-1-1-2	180.00	180.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
3-1-1-3			180.00	180.00	
4	-6.679	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
5	-18.560	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
6	-14.570	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
7	-8.980	2-1-1-2	0.00	0.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
8	-7.315	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
F1:F2	1	-7.774	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-6.150	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	90.00	
3-1-1-3			180.00	180.00	
3	-6.693	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	90.00	
4	-7.069	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
3-1-1-3			0.00	0.00	
	F1:F3	1	-8.922	2-1-1-2	0.00
2-1-1-3				90.00	90.00
3-1-1-3				90.00	90.00
2		-15.638	2-1-1-2	90.00	90.00
	2-1-1-3		90.00	0.00	
	3-1-1-3		90.00	90.00	
3	-7.245	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-6.876	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
F1:F4	1	-8.521	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-8.496	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	90.00	
3-1-1-3			0.00	0.00	
3	-4.299	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-4.293	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
F1:F5	1	-12.320	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-17.510	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	0.00	
3-1-1-3			90.00	90.00	
3	-13.390	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-13.170	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
F2:F2	1	-7.500	2-1-1-2	180.00	180.00
	2	-11.310	2-1-1-2	180.00	180.00
	3	-3.118	2-1-1-2	180.00	180.00
3-1-1-3	0.00	0.00			
F2:F3	1	-9.950	2-1-1-2	90.00	90.00
	2	-7.650	2-1-1-3	180.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
3	-7.170	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
F2:F4	1	-4.720	2-1-1-2	0.00	0.00
	2	-11.700	2-1-1-3	0.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
3	-12.670	2-1-1-2	0.00	0.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
F2:F5	1	-9.520	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-6.300	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-21.890	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
F3:F3	1	-19.430	2-1-1-2	0.00	0.00
	2	-13.080	2-1-1-3	180.00	180.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
3	-23.260	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
F3:F4	1	-18.730	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-17.530	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-8.850	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
F3:F5	1	-18.060	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-12.880	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	0.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
3	-38.770	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	0.00	0.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
F4:F4	1	-9.140	2-1-1-2	180.00	180.00
			2-1-1-3	180.00	180.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
2	-9.860	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-10.360	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
F4:F5	1	-36.260	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	180.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-9.510	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-12.550	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
F5:F5	1	-56.630	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	180.00	180.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
2	-6.330	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
3	-61.040	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	

Tabla 1. Parámetros de energías para las interacciones $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$

Concacto	#	E (kJ/mol)	Configuraciones		
			Puntos	Angulo _{ij}	Angulo _{ji}
C1:C1	1	-12.790	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
			3-1-1-3	0.00	0.00
	2	-10.510	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	3	-4.480	2-1-1-2	180.00	180.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
3-1-1-3			180.00	180.00	
4	-5.510	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
5	-23.430	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
6	-10.000	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
7	-11.070	2-1-1-2	0.00	0.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
8	-5.290	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C1:C2	1	-9.050	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-6.050	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	90.00	
3-1-1-3			180.00	180.00	
3	-10.990	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-10.080	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
C1:C3	1	-10.080	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-13.970	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	0.00	
3-1-1-3			90.00	90.00	
3	-18.530	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-10.260	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C1:C4	1	-6.750	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-8.740	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	90.00	
3-1-1-3			0.00	0.00	
3	-11.260	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-7.640	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
C1:C5	1	-9.030	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-20.030	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	0.00	
3-1-1-3			90.00	90.00	
3	-19.420	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-9.510	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	

Concacto	#	E (kJ/mol)	Configuraciones		
			Puntos	Angulo _{ij}	Angulo _{ji}
C2:C2	1	-10.380	2-1-1-2	180.00	180.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
	2	-9.810	2-1-1-2	180.00	180.00
C2:C3	1	-9.010	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-7.530	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-7.320	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C2:C4	1	-7.450	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
	2	-5.880	2-1-1-2	0.00	0.00
C2:C5	1	-7.760	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-4.998	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-23.360	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C3:C3	1	-13.010	2-1-1-2	0.00	0.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
	2	-8.210	2-1-1-2	90.00	90.00
C3:C4	1	-13.080	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-15.420	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-18.002	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C3:C5	1	-24.940	2-1-1-2	0.00	0.00
			3-1-1-3	0.00	0.00
	2	-7.190	2-1-1-2	90.00	90.00
C4:C4	1	-3.380	2-1-1-2	180.00	180.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
			2	-4.280	2-1-1-2
C4:C5	1	-28.904	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	180.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-8.460	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-9.690	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C5:C5	1	-11.150	2-1-1-2	0.00	0.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
	2	-7.490	2-1-1-2	90.00	90.00
3	-26.590	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	

Tabla 2. Parámetros de energías para las interacciones $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$

Concacto	#	E (kJ/mol)	Configuraciones		
			Puntos	Angulo _{ij}	Angulo _{ji}
C1:F1	1	-10.970	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
			3-1-1-3	0.00	0.00
	2	-14.660	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	3	-7.210	2-1-1-2	180.00	180.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
3-1-1-3			180.00	180.00	
4	-6.240	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
5	-19.460	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
6	-12.010	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
7	-13.460	2-1-1-2	0.00	0.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
8	-9.740	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C1:F2	1	-7.740	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-15.090	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	90.00	
3-1-1-3			180.00	180.00	
3	-13.310	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-8.380	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
C1:F3	1	-8.070	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-12.950	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	0.00	
3-1-1-3			90.00	90.00	
3	-6.470	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-7.230	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C1:F4	1	-14.030	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-9.200	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	90.00	
3-1-1-3			0.00	0.00	
3	-8.300	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-7.860	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
C1:F5	1	-8.030	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	90.00	90.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
	2	-6.120	2-1-1-2	90.00	90.00
2-1-1-3			90.00	0.00	
3-1-1-3			90.00	90.00	
3	-7.810	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
4	-5.830	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	

Concacto	#	E (kJ/mol)	Configuraciones		
			Puntos	Angulo _{ij}	Angulo _{ji}
C2:F2	1	-7.570	2-1-1-2	180.00	180.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
	2	-10.470	2-1-1-2	180.00	180.00
C2:F3	1	-9.620	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-6.370	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-8.080	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C2:F4	1	-8.180	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
	2	-6.430	2-1-1-2	0.00	0.00
C2:F5	1	-7.970	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-10.930	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	90.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-9.950	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	0.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C3:F3	1	-18.780	2-1-1-2	0.00	0.00
			3-1-1-3	180.00	180.00
	2	-10.500	2-1-1-2	90.00	90.00
C3:F4	1	-15.520	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	0.00	0.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-13.530	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	90.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-7.740	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	0.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
C3:F5	1	-27.910	2-1-1-2	0.00	0.00
			3-1-1-3	0.00	0.00
	2	-8.830	2-1-1-2	90.00	90.00
C4:F4	1	-14.490	2-1-1-2	180.00	180.00
			2-1-1-3	180.00	180.00
			3-1-1-3	0.00	0.00
2	-15.460	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	90.00	90.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	
3	-14.650	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	0.00	0.00	
		3-1-1-3	0.00	0.00	
C4:F5	1	-13.100	2-1-1-2	90.00	90.00
			2-1-1-3	180.00	180.00
	2	-9.210	2-1-1-2	90.00	90.00
C5:F5	1	-31.290	2-1-1-2	0.00	0.00
			2-1-1-3	180.00	180.00
			3-1-1-3	90.00	90.00
2	-5.240	2-1-1-2	90.00	90.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	90.00	90.00	
3	-43.840	2-1-1-2	180.00	180.00	
		2-1-1-3	180.00	180.00	
		3-1-1-3	180.00	180.00	

Tabla 3. Parámetros de energías para las interacciones $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_C$

Anexo 4. Parámetros de energías para las simulaciones

Conctacto	#	Distancia (nm)	E (kJ/mol)	Conctacto	#	Distancia (nm)	E (kJ/mol)
F1:F1	1	3.0	-11.852	F2:F3	1	4.0	-9.950
	2	3.2	-7.697		2	4.2	-7.650
	3	3.0	-15.898		3	4.2	-7.170
	4	3.2	-6.679	F2:F4	1	5.2	-4.720
	5	3.0	-18.560		2	5.0	-11.700
	6	3.0	-14.570		3	4.8	-12.670
	7	3.4	-8.980	F2:F5	1	3.8	-9.520
	8	3.2	-7.315		2	4.0	-6.300
F1:F2	1	4.0	-7.774	3	3.6	-21.890	
	2	4.0	-6.150	F3:F3	1	3.2	-19.430
	3	4.0	-6.693		2	3.2	-13.080
	4	4.0	-7.069		3	3.0	-23.260
F1:F3	1	3.2	-8.922	F3:F4	1	4.0	-18.730
	2	3.0	-15.638		2	4.0	-17.530
	3	3.2	-7.245		3	4.2	-8.850
	4	3.2	-6.876	F3:F5	1	2.8	-18.060
1	4.0	-8.521	2		3.0	-12.880	
2	4.0	-8.496	3		2.8	-38.770	
F1:F4	3	4.2	-4.299	F4:F4	1	5.2	-9.140
	4	4.2	-4.293		2	4.8	-9.860
	1	3.0	-12.320		3	5.2	-10.360
	2	2.6	-17.510	F4:F5	1	3.6	-36.260
3	3.0	-13.390	2		3.8	-9.510	
4	2.8	-13.170	3		4.0	-12.550	
F2:F2	1	5.0	-7.500	F5:F5	1	2.6	-56.630
	2	5.0	-11.310		2	3.0	-6.330
	3	5.2	-3.118		3	2.8	-61.040

Tabla 4. Distancias de equilibrio para las interacciones $\beta 2m_L$ - $\beta 2m_L$.

Conctacto	#	Distancia (nm)	E (kJ/mol)	Conctacto	#	Distancia (nm)	E (kJ/mol)
C1:C1	1	3.0	-12.790	C2:C3	1	4.0	-9.010
	2	3.0	-10.510		2	4.2	-7.530
	3	3.4	-4.480		3	4.0	-7.320
	4	3.2	-5.510	C2:C4	1	5.0	-7.450
	5	2.8	-23.430		2	5.0	-5.880
	6	3.0	-10.000		3	5.0	-6.970
	7	3.0	-11.070	C2:C5	1	3.8	-7.760
	8	3.2	-5.290		2	4.0	-4.998
C1:C2	1	4.0	-9.050	3	3.6	-23.360	
	2	4.0	-6.050	C3:C3	1	3.2	-13.010
	3	3.8	-10.990		2	3.2	-8.210
	4	4.0	-10.080		3	3.0	-26.940
C1:C3	1	4.0	-10.080	C3:C4	1	4.0	-13.080
	2	3.0	-13.970		2	4.0	-15.420
	3	3.0	-18.530		3	4.0	-18.002
	4	3.0	-10.260	C3:C5	1	2.8	-24.940
1	4.0	-6.750	2		3.0	-7.190	
2	4.0	-8.740	3		2.8	-22.930	
C1:C4	3	4.0	-11.260	C4:C4	1	5.2	-3.380
	4	4.0	-7.640		2	5.2	-4.280
	1	3.0	-9.030		3	5.0	-8.770
	2	2.6	-20.030	C4:C5	1	3.6	-28.904
3	2.8	-19.420	2		3.8	-8.460	
4	2.8	-9.510	3		3.8	-9.690	
C2:C2	1	5.0	-10.380	C5:C5	1	3.0	-11.150
	2	5.0	-9.810		2	2.8	-7.490
	3	5.0	-5.520		3	2.4	-26.590

Tabla 5. Distancias de equilibrio para las interacciones $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_C$.

Conctacto	#	Distancia (nm)	E (kJ/mol)	Conctacto	#	Distancia (nm)	E (kJ/mol)	
C1:F1	1	3.0	-10.970	C2:F3	1	4.0	-9.620	
	2	3.0	-14.660		2	4.2	-6.370	
	3	3.2	-7.210		3	4.2	-8.080	
	4	3.2	-6.240	C2:F4	1	5.0	-8.180	
	5	3.0	-19.460		2	5.0	-6.430	
	6	3.0	-12.010		3	5.0	-7.060	
	C1:F2	7	3.0	-13.460	C2:F5	1	3.8	-7.970
		8	3.2	-9.740		2	3.8	-10.930
1		4.0	-7.740	3		3.8	-9.950	
2		3.8	-15.090	C3:F3	1	3.2	-18.780	
3		3.8	-13.310		2	3.2	-10.500	
4		4.0	-8.380		3	3.0	-23.800	
C1:F3		1	3.2	-8.070	C3:F4	1	4.0	-15.520
		2	3.0	-12.950		2	4.0	-13.530
	3	3.2	-6.470	3		4.2	-7.740	
	4	3.2	-7.230	C3:F5	1	2.8	-27.910	
C1:F4	1	3.8	-14.030		2	3.0	-8.830	
	2	4.0	-9.200		3	3.0	-10.190	
	3	4.0	-8.300	C4:F4	1	5.0	-14.490	
	4	4.0	-7.860		2	5.0	-15.460	
C1:F5	1	3.0	-8.030		3	5.0	-14.650	
	2	3.0	-6.120	C4:F5	1	3.8	-13.100	
	3	3.0	-7.810		2	3.8	-9.210	
	4	3.0	-5.830		3	3.8	-12.430	
C2:F2	1	5.0	-7.570	C5:F5	1	2.8	-31.290	
	2	5.0	-10.470		2	3.0	-5.240	
	3	5.0	-6.410		3	2.8	-43.840	

Tabla 6. Distancias de equilibrio para las interacciones $\beta 2m_C$ - $\beta 2m_L$