



Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química

Modelado molecular de los receptores CXCR3A y CXCR3B
para el diseño de moléculas con potencial antagonista para el
tratamiento del vitiligo.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias Químico Biológicas

PRESENTA

QFB. Alex Daniel Rivera Vargas

DIRIGIDA POR:

DR. Rubén Antonio Romo Mancillas

Querétaro, Qro. A agosto 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Modelado molecular de los receptores CXCR3A y
CXCR3B para el diseño de moléculas con potencial
antagonista para el tratamiento del vitiligo.

por

Alex Daniel Rivera Vargas

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-253124



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Modelado molecular de los receptores CXCR3A y CXCR3B
para el diseño de moléculas con potencial antagonista para el
tratamiento del vitiligo.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

Alex Daniel Rivera Vargas

Dirigida por:

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Presidente

Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz
Secretario

Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado
Vocal

Dr. José Alejandro García Arredondo
Suplente

Dr. César Ibarra Alvarado
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Agosto 2023

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen | 2 |
| Abstract | 3 |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Antecedentes. | 1 |
| 2.1. Definición. | 1 |
| 2.2. Clasificación | 2 |
| 2.2.1. Vitiligo no segmentado (VNS)..... | 2 |
| 2.2.2. Vitiligo segmentado (VS) | 3 |
| 2.2.3. Vitiligo mixto..... | 3 |
| 2.3. Melanocito..... | 3 |
| 2.3.1. Melanogénesis..... | 3 |
| 2.4. Etiología del vitiligo..... | 4 |
| 2.4.1. Teoría autoinmune y ROS. | 5 |
| 2.5. Tratamiento | 8 |
| 2.6. Blancos de interés en vitiligo..... | 9 |
| 2.6.1. Relevancia de receptores a quimiocinas en vitiligo | 9 |
| 2.6.2. Antagonismo de receptor de quimiocinas CXCR3..... | 10 |
| 2.6.2.1. Receptor a quimiocinas CXCR3A | 11 |
| 2.7. Diseño de fármacos asistido por computadora | 13 |
| 2.7.1. Modelado por homología | 13 |
| 2.7.2. Simulaciones de dinámica molecular (MD)..... | 14 |
| 2.7.3. Acoplamiento molecular (<i>docking</i>) proteína-proteína..... | 15 |
| 2.7.4. Acoplamiento molecular proteína-ligando. | 16 |

| | |
|--|----|
| 3. Justificación..... | 17 |
| 4. Hipótesis | 17 |
| 5. Objetivo general | 18 |
| 6. Objetivos particulares..... | 18 |
| 6.1. Estudiar, por métodos computacionales, la interacción de CXCR3A y CXCR3B con CXCL10..... | 18 |
| 7. Metodología | 19 |
| 7.1. Estudio computacional de la interacción de CXCR3A y CXCR3B con CXCL10..... | 19 |
| 7.1.1. Modelado por homología de CXCR3B y CXCL10. | 19 |
| 7.1.2. Descripción los cambios conformacionales de CXCR3A y CXCR3B en complejo con CXCL10, mediante acoplamiento molecular proteína-proteína y simulaciones de dinámica molecular..... | 19 |
| 7.1.2.1. Construcción de los complejos CXCR3A-CXCL10 y CXCR3B-CXCL10 | 19 |
| 7.1.2.2. Preparación de los sistemas para las simulaciones de dinámica molecular Coarse-Grained (CG-MD)..... | 20 |
| 7.1.2.3. Simulaciones CG-MD | 20 |
| 8. Resultados y discusión..... | 23 |
| 8.1. Modelado por homología de CXCR3B y CXCL10..... | 23 |
| 8.2. Construcción de complejos CXCR3B-CXCL10 y CXCR3A-CXCL10 | 26 |
| 8.2.1. Construcción del complejo CXCR3B-CXCL10..... | 26 |
| 8.2.2. Construcción del complejo CXCR3A-CXCL10..... | 29 |
| 8.3. Simulación CG-MD..... | 32 |
| 8.3.1. Simulación CG-MD de CXCR3B..... | 32 |
| 8.3.2. Simulación CG-MD del complejo CXCR3B-CXCL10..... | 34 |

| | |
|---|----|
| 8.3.3. Simulación CG-MD de CXCR3A..... | 38 |
| 8.3.4. Simulación CG-MD del complejo CXCR3B-CXCL10..... | 40 |
| 8.3.5. Gráficas de distancia y RMSF de las simulaciones. | 44 |
| 9. Conclusiones..... | 47 |
| 10. Bibliografía | 48 |

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de beca de maestría (CVU: 1140854) y por el proyecto de Ciencia Básica A1-S-17090 (SEP-CONACYT-CB2017-2018) que hizo posible la adquisición del equipo utilizado en las simulaciones y análisis computacionales, A la Universidad Autónomas de Querétaro por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en el Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Facultad de Química.

Al Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos por el apoyo brindado todos estos años.

A mis sinodales al Dr. Rodrigo, el Dr. Cesar, el Dr. Julio y el Dr. Alejandro por apoyarme durante mis exámenes tutorales para llevar a término este proyecto. A mi director de tesis, el Dr. Antonio Romo Mancillas por apoyarme y enseñarme tanto durante este proceso y al Dr. Giovanny Aguilera Durán, quien me apoyó incondicionalmente durante mi trayecto y que fue pieza clave para que este proyecto saliera adelante.

A mis compañeros, Bety, Fernanda, Stephanie y Manuel quienes me alentaban y me sacaban una carcajada durante las horas de trabajo.

Pero, sobre todo, gracias a mi familia; mi papá por siempre apoyarme, escucharme y quererme tanto. A mis padres por sacarme adelante toda la vida y siempre estar para mí, incondicionalmente. A mis hermanos por apoyarme durante toda mi vida y ayudarme a alcanzar mis metas.

Gracias.

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Ruta biosintética de los diferentes tipos de melanina..... | 4 |
| Figura 2 Comunicación celular entre un linfocito T CD8 ⁺ y una célula de la piel | 7 |
| Figura 3 Objetivo de tratamientos para el vitiligo..... | 9 |
| Figura 4 Estructuras de CXCR3B y CXCL10..... | 23 |
| Figura 5 Diagramas de Ramachandran..... | 24 |
| Figura 6 Modelos CXCR3B y CXCR3A..... | 25 |
| Figura 7 Modelos representativos del complejo CXCR3B..... | 27 |
| Figura 8 Primera interacción de CXCR3B con CXCL10..... | 28 |
| Figura 9 Modelos representativos del complejo CXCR3B..... | 30 |
| Figura 10 Primera interacción de CXCR3A con CXCL10..... | 31 |
| Figura 11 Rotación de segmentos transmembranales de CXCR3B..... | 32 |
| Figura 12 RMSD de CXCR3B..... | 33 |
| Figura 13 Rotación de los segmentos transmembrana de CXCR3B-CXCL10..... | 34 |
| Figura 14 RMSD del complejo CXCR3B-CXCL10..... | 35 |
| Figura 15 Rotación de segmentos transmembranales de CXCR3A..... | 38 |
| Figura 16 RMSD de CXCR3A..... | 39 |
| Figura 17 Rotación de los segmentos transmembranales de CXCR3A-CXCL10..... | 40 |
| Figura 18 RMSD del complejo CXCR3A-CXCL10..... | 42 |
| Figura 19 Distancia de CXCR3A y CXCR3B con respecto a CXCL10..... | 44 |
| Figura 20 <i>frames</i> representativos de los complejos CXCR3A y CXCR3B..... | 45 |
| Figura 21 RMSF de CXCR3B y CXCR3A..... | 46 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Aminoácidos relevantes para las interacciones entre CXCR3 y sus quimiocinas | 12 |
| Tabla 2 Etapas de una simulación de dinámica molecular | 15 |
| Tabla 3 Scores de clúster de CXCR3B..... | 26 |
| Tabla 4 Scores de clúster de CXCR3A..... | 29 |
| Tabla 5 Residuos de segmentos transmembranales en CXCR3B y CXCR3A..... | 31 |
| Tabla 6 Interacciones importantes de los TMs de CXCR3B..... | 33 |
| Tabla 7 Interacciones del estado meta-activo de CXCR3B..... | 36 |
| Tabla 8 Interacciones importantes de los TMs del complejo CXCR3B-CXCL10..... | 37 |
| Tabla 9 Interacciones polares de CXCR3B importantes para la unión a CXCL10 *Glu34 se encuentra en los 47 residuos únicos de CXCR3B..... | 37 |
| Tabla 10 Interacciones importantes de los TMs de CXCR3A..... | 39 |
| Tabla 11 Interacciones importantes de los TMs del complejo CXCR3A-CXCL10..... | 42 |
| Tabla 12 Interacciones importantes de los TMs del complejo CXCR3A-CXCL10..... | 43 |
| Tabla 13 Interacciones polares de CXCR3A importantes para unirse a CXCL10..... | 43 |

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Atentamente:

QFB. Alex Daniel Rivera Vargas.

Resumen

El vitiligo es una enfermedad caracterizada por la despigmentación de la piel, afectando al 1-3% de la población mexicana, estando entre el tercer y quinto lugar en enfermedades dermatológicas. La presencia de las células T en el vitiligo se ve marcada por la inflamación perilesional ocasionada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, donde los linfocitos T CD8⁺ son los responsables de la muerte de los melanocitos. Las células T son guiadas para su migración por las quimiocinas, una de las quimiocinas sobreexpresadas en sangre de pacientes con vitiligo es CXCL10, mientras que en los linfocitos T CD8⁺ se sobreexpresa su receptor CXCR3A, promoviendo quimiotaxis. En etapas tempranas de la enfermedad en los melanocitos se sobreexpresa CXCR3B, cuya interacción con CXCL10 promueve apoptosis. Existen diferentes tratamientos para el vitiligo, pero ninguno es 100% efectivo. En este trabajo, se construyó un modelo de homología de CXCR3B y CXCL10, un ligando natural de CXCR3, para estudiar las interacciones entre CXCR3B y CXCL10. Se realizaron simulaciones de dinámica Coarse-Grained para observar interacciones, rotaciones de segmentos transmembrana (TM) y cambios conformacionales de los receptores CXCR3B y CXCR3A solos y en complejo con CXCL10. Las simulaciones mostraron que los TM de mayor relevancia en CXCR3B son TM1, TM2, TM5 y TM7, debido a las interacciones entre ellos que se forman y se pierden en presencia de CXCL10 para alcanzar el estado meta-activo. La red polar perdió entre TM1-TM7, TM3-TM7, TM3-TM5 y TM5-TM6. TM5 es un punto de ruptura para la formación de nuevas interacciones que son TM1-TM2, TM2-TM7 y TM6-TM7. La distancia entre el centro de masa de CXCL10 y CXCR3B disminuyó a lo largo de la simulación, lo que sugiere que CXCR3B alcanza el primer paso de la activación del receptor de quimiocinas como CXCR3A. Por el contrario, en CXCR3A, encontramos diferencias interesantes en CXCR3B, TM2, TM3 y TM7 que son importantes en el estado meta-activo de CXCR3A. Aún así, la red polar es sorprendentemente diferente: CXCR3B y CXCR3A solo comparten una interacción entre ellos en TM2-TM7 (Asp146-Asn361 y Asp99-Asn314, respectivamente). Esta información podría ser útil para el nuevo diseño de moléculas específicas de isoformas.

Palabras clave: vitiligo, estrés oxidativo, autoinmune, células T, linfocitos T CXCR3, CXCL10 CD8⁺, modelado de homología, actividad inhibidora de diseño computacional.

Abstract

Vitiligo is a disease characterized by depigmentation of the skin, affecting 1-3% of the Mexican population, being between the third and fifth place in dermatological diseases. The presence of T cells in vitiligo is marked by perilesional inflammation caused by CD4+ and CD8+ T lymphocytes, where CD8+ T lymphocytes are responsible for the death of melanocytes. T cells are guided for their migration by chemokines, one of the chemokines overexpressed in the blood of patients with vitiligo is CXCL10, while in CD8+ T lymphocytes its CXCR3A receptor is overexpressed, promoting chemotaxis. In early stages of the disease, CXCR3B is overexpressed in melanocytes, whose interaction with CXCL10 promotes apoptosis. There are different treatments for vitiligo, but none is 100% effective. In this work, a homology model of CXCR3B and CXCL10, a natural ligand of CXCR3, was constructed to study the interactions between CXCR3B and CXCL10. Coarse-grained dynamics simulations were performed to observe interactions, transmembrane (TM) segment rotations, and conformational changes of CXCR3B and CXCR3A receptors alone and in complex with CXCL10. The simulations showed that the most relevant TMs in CXCR3B are TM1, TM2, TM5 and TM7, due to the interactions between them that are formed and lost in the presence of CXCL10 to reach the meta-active state. The polar network lost between TM1-TM7, TM3-TM7, TM3-TM5 and TM5-TM6. TM5 is a breakpoint for the formation of new interactions that are TM1-TM2, TM2-TM7 and TM6-TM7. The distance between the center of mass of CXCL10 and CXCR3B decreased throughout the simulation, suggesting that CXCR3B reaches the first step of chemokine receptor activation like CXCR3A. By contrast, in CXCR3A, we found interesting differences in CXCR3B, TM2, TM3, and TM7 that are important in the meta-active state of CXCR3A. Still, the polar network is strikingly different: CXCR3B and CXCR3A only share one interaction with each other in TM2-TM7 (Asp146-Asn361 and Asp99-Asn314, respectively). This information could be useful for the new design of isoform-specific molecules.

Key words: Vitiligo, oxidative stress, autoimmune, T-cell, CXCR3, CXCL10 CD8+ T lymphocytes, homology modeling, computational design, inhibitory activity.

1. Introducción

El vitiligo es una enfermedad de la piel caracterizada por la despigmentación de la epidermis dando origen a lesiones de color blanco. Esta enfermedad afecta entre el 0.5-2.0% de la población mundial y en México entre el 1% y 3% de la población lo padecen, posicionando al vitiligo entre el tercer y quinto lugar en enfermedades de dermatosis en México y entre el 2-4% de todos los pacientes dermatológicos.¹⁻³ La etiología del vitiligo puede ser explicada por diversos factores como son: factores genéticos, estrés oxidativo y autoinmunidad, entre otros. Recientemente, la teoría más aceptada es la combinación del estrés oxidativo y la autoinmunidad, lo que deriva en la destrucción del melanocito mediada por los linfocitos T CD8⁺, la cual podría ser evitada si se inhibe la quimiotaxia de los linfocitos T CD8⁺, antagonizando a los receptores de quimiocinas y evitando así, la migración de células del sistema inmune.^{1,4,5} Los receptores a quimiocinas CXCR3A y CXCR3B juegan un papel muy importante en la quimiotaxis de las células T CD8⁺ y la apoptosis de melanocitos, respectivamente, pues al ser estimuladas por su quimiocina natural CXCL10 provocan la quimiotaxis de las células T melanocitotóxicas. Estudios previos han demostrado una sobreexpresión de la quimiocina CXCL10 junto con sus respectivos receptores, en pacientes con vitiligo en comparación con pacientes sanos. El receptor a quimiocinas CXCR3 cuenta con 3 isoformas, CXCR3A, CXCR3B y CXCR3-alt, de las cuales CXCR3A y CXCR3B tienen un papel importante en el vitiligo, pues CXCR3B se encuentra sobreexpresado en las etapas tempranas del vitiligo, provocando la apoptosis del melanocito y CXCR3A promueve la quimiotaxis de las células T CD8⁺.⁶⁻¹⁵ Existen diferentes tratamientos para el vitiligo, pero ninguno es 100% efectivo ni tampoco todos los tratamientos funcionan con todas las personas.^{16,17} Por este motivo es necesario estudiar y comprender los procesos relacionados a la activación de los receptores CXCR3A y CXCR3B involucrados en la fisiopatología del vitiligo y de esta manera diseñar nuevas moléculas con potencial efecto antagonista para servir como nuevos tratamientos para esta enfermedad.

2. Antecedentes.

2.1. Definición.

El vitiligo es una enfermedad hipopigmentaria, de origen autoinmune de la piel caracterizada por máculas blancas, provocado por la falta de melanocitos. Cualquiera

persona puede desarrollar vitiligo, no se tiene un sexo o edad predilecta, pero es poco común el diagnóstico del vitiligo en el nacimiento, pues podría diagnosticarse erróneamente como albinismo localizado. Las lesiones de vitiligo tienen tendencia de aparecer en cara, manos, muñecas, axilas, ombligo, boca, cabello y otras zonas periorificiales. La prevalencia de esta enfermedad varía por región geográfica y por edad. Estudios epidemiológicos en los últimos años resaltan las comorbilidades autoinmunes asociadas como diabetes mellitus, enfermedad tiroidea autoinmune, artritis reumatoide, enfermedad de Addison, entre otras.¹⁻³ El vitiligo afecta aproximadamente a 70 millones de personas a nivel mundial independientemente de su color de piel, sexo u origen étnico.¹⁸ En México, el vitiligo se ha descrito entre el tercer y quinto lugar de las enfermedades dermatológicas, representando entre el 2-4% de los pacientes dermatológicos.¹⁹

Es necesario considerar al vitiligo como una enfermedad de alto impacto psicológico. Un estudio realizado en la ciudad de México demostró que existe una relación entre depresión y ansiedad del 34% y 60%, respectivamente, en pacientes que padecen vitiligo.²⁰ Los médicos, al priorizar el tratamiento, no ven las posibles afecciones psicológicas que puede presentar el paciente. Pacientes afectados por esta enfermedad llegan ser víctimas de discriminación social y son vistas como inferiores, debido a la percepción de algunas personas hacia aquellas portadoras de características “diferentes”, haciendo una comparación con aquellas que no tienen alguna alteración visible en la piel.²¹

Por años, los investigadores de esta enfermedad han señalado varias teorías que podrían explicar la destrucción del melanocito, por ejemplo: la teoría genética, la teoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS), la teoría neural, la teoría autoinmune, entre otras. La teoría más aceptada apunta a que la aparición del vitiligo podría ser provocada por una relación entre la teoría de las especies reactivas de oxígeno y la actividad autoinmune, promoviendo el desarrollo de la enfermedad.^{22,23}

2.2. Clasificación

La clasificación del vitiligo fue definida en 2001 durante la Conferencia Internacional de la célula del pigmento, en 3 tipos principales de vitiligo: vitiligo segmentado (VS), vitiligo no segmentado (VNS) y vitiligo mixto (VM).^{24,25}

2.2.1. Vitiligo no segmentado (VNS)

El vitiligo no segmentado es uno de los más comunes, que está presente en cerca del 85-90% de los casos. En el VNS, la zona inicial más común es la cara (39%), seguida por el tronco anterior (23.6%), el cuello (10.4%) y el cuello posterior (9.1%)²². Este tipo de vitiligo

se caracteriza por máculas blancas de tamaño variable, generalmente involucrando ambos lados del cuerpo en una distribución que tiende a ser simétrica. Al contrario del vitiligo segmentado, el vello corporal se mantiene pigmentado en la mayoría de los casos. Sin embargo, la despigmentación del cabello puede presentarse una vez avanzada la enfermedad.²⁵

2.2.2. Vitiligo segmentado (VS)

La distribución segmentada es la característica determinante para diferenciarse del VNS, ya que se limita a una zona definida. También, se identificó que el VS afecta mayormente a niños de entre 0 y 7 años. Una vez que aparece el VS tiende a expandirse rápidamente y detiene su avance una vez pasado un año de formarse la primera lesión, al contrario del vitiligo no segmentado donde las lesiones continúan apareciendo en el paciente durante toda su vida.²⁶

2.2.2.1.1. Vitiligo mixto

Una coexistencia de VS y VNS fue encontrada por primera vez en un paciente pediátrico tras haberse tratado el VS con radiación ultravioleta B (UVB), generando una muerte del melanocito similar a la vista en el VNS. Una de las formas más comunes de su identificación es un segmento resistente a la fototerapia en un paciente previamente identificado como VNS.²⁷

2.3. Melanocito

La célula afectada por el vitiligo es el melanocito, la cual es la célula con la capacidad de producir melanina, un polímero sintetizado mediante el proceso de la melanogénesis. Estas células cuentan con una forma ramificada con alargadas prolongaciones entre los queratinocitos vecinos. Los melanocitos tienen una interacción importante con los queratinocitos pues envían la melanina, lo que determina el color de la piel y provee de protección a los efectos dañinos de la radiación ultravioleta.²⁸

La actividad melanogénica es la que determina el nivel de pigmentación en la piel, por lo tanto, cuando se encuentra bajo condiciones normales como destrucción del melanocito o alguna falla en la melanogénesis, la pigmentación de la piel se ve afectada drásticamente.²⁹

2.3.1. Melanogénesis

La síntesis de la melanina tiene lugar en el melanosoma, un organelo intracelular especializado y rodeado de una membrana originada a partir del retículo endoplasmático. Durante este proceso el melanosoma adquiere la enzima tirosinasa (TYR) que cataliza la

conversión de L-tirosina (L-Tyr) a dihidroxifenilalanina quinona (DOPAquinona) y las proteínas relacionadas con la tirosinasa 1 y 2 (TRP-1 y TRP-2 o Dopacromo tautomerasa) actúan en la melanogénesis como oxidasa del ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) y tautomerasa de la dihidroxifenilalanina cromo (DOPAcromo), respectivamente (Figura 1). Este proceso da como resultado la eumelanina que provee el color negro-marrón y la feomelanina que provee la coloración rojizo-amarilla. La eumelanina está altamente presente en los queratinocitos de individuos de cabello y piel oscura, siendo este tipo de melanina el que mayor efecto protector posee.³⁰

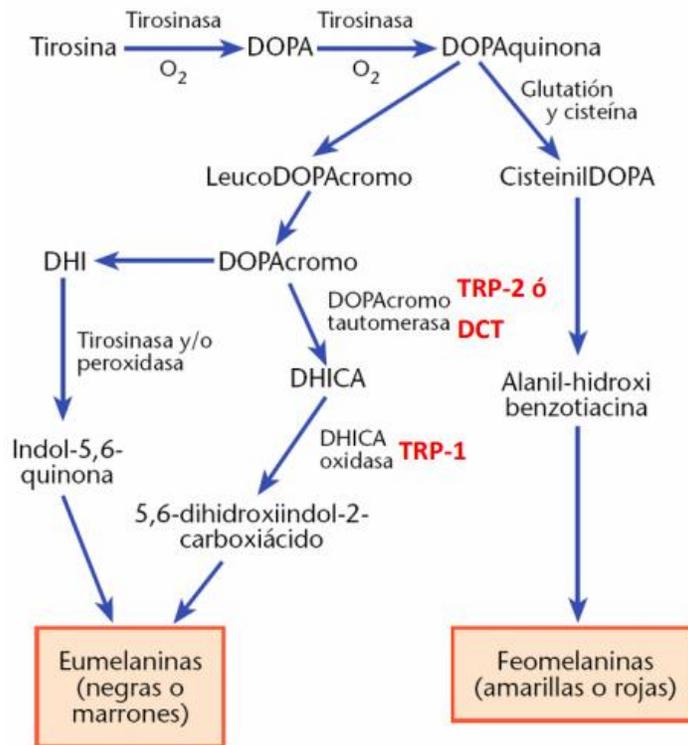


Figura 1. Ruta biosintética de los diferentes tipos de melanina. ²⁹

Una vez es producida la melanina, los melanosomas son transferidos a los queratinocitos vecinos. Dependiendo del número y tamaño de estos orgánulos será determinada la pigmentación. Los melanosomas en coloraciones oscuras de la piel son más grandes, en contraste con los melanosomas de coloraciones claras que son mucho más pequeños.⁴

2.4. Etiología del vitiligo

Existen diferentes teorías para explicar la fisiopatología del vitiligo: la teoría neural propuesta en 1950 seguida de factores genéticos asociados, la teoría autoinmune y la teoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*).⁵ La teoría genética

fue propuesta por primera vez en 1950 cuando Stüttgen y Teindel reportaron simultáneamente un total de 8 familias con varios familiares afectados por el vitiligo, reportándose una frecuencia del vitiligo entre familiares de un 11-38%. Se han identificado cerca de 50 *loci* diferentes que contribuyen al riesgo del vitiligo. Casi todos los genes identificados codifican proteínas involucradas en la inmunorregulación, la apoptosis y la función de los melanocitos, lo que implica la base autoinmune del vitiligo, con programación inmunitaria desregulada, activación celular y reconocimiento y muerte de los melanocitos.³¹ La teoría neural nos habla sobre la secreción de ciertos mediadores neuroquímicos como el neuropéptido Y que se encontró en altas concentraciones en pacientes con vitiligo, tanto en plasma como en la piel, siendo citotóxico para los melanocitos.³²⁻³⁴ Por otra parte, la teoría del estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno menciona que varios factores como la estimulación exógena y endógena de ROS, niveles bajos de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, polimorfismo en genes asociados a ROS, irradiación ultravioleta, traumatismos, estrés, desbalance de calcio, entre otras, promueven la producción exacerbada de ROS en los melanocitos. Todos estos factores contribuyen a la acumulación de ROS y por consiguiente a algunos efectos nocivos como: peroxidación de membranas, disminución del potencial de membrana mitocondrial, vacuolización y apoptosis de melanocitos y queratinocitos en la epidermis, llevando finalmente a la producción de autoantígenos a través de la acumulación de péptidos y proteínas mal plegadas, y una señal de destrucción para las células fagocíticas desencadenada por la calreticulina.³⁵

Finalmente, la teoría autoinmune está basada en la evidencia del papel de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos y autoanticuerpos de clase IgG en la destrucción de los melanocitos y la frecuente asociación del vitiligo a otras enfermedades autoinmunes como enfermedad tiroidea, artritis reumatoide (AR), alopecia areata, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes mellitus y psoriasis.³⁶ Algunos casos de vitiligo son esporádicos, pero la presencia de la enfermedad en familias ha sido positiva en varios estudios, 6.23-38% de los casos presentan familiares con vitiligo.^{1,37}

2.4.1. Teoría autoinmune y ROS.

Muchos factores pueden contribuir en la patogénesis autoinmune del vitiligo incluyendo predisposición genética, metabolitos tóxicos que interfieren con el metabolismo de la melanina, factores neuroquímicos y autoinmunidad específica contra el melanocito. En años recientes se considera al estrés oxidativo y la teoría autoinmune como los principales causantes del vitiligo.³⁸

La teoría del estrés oxidativo, como se mencionó anteriormente, involucra la acumulación de ROS, lo cual provocaría una acumulación de autoantígenos a través del incremento de péptidos y proteínas mal plegadas, desencadenando en una señal de destrucción para los melanocitos,³⁵ siendo esta la conexión de la teoría de ROS y la teoría autoinmune, donde la llamada del sistema inmune para la destrucción del melanocito, sería el inicio de la teoría autoinmune.

La teoría autoinmune nos habla sobre la destrucción del melanocito por acción del sistema inmune, causado por diferentes mecanismos, los autoanticuerpos IgG, tirosinasa y proteínas relacionadas con la tirosinasa (TRP1 y TRP2), produciendo anticuerpos contra proteínas del melanocito.³⁹ Se ha demostrado el aumento constante de autoanticuerpos, siendo en su mayoría autoanticuerpos IgG e IgM dirigidos contra las proteínas de membrana o proteínas mal plegadas expresadas en la membrana del melanocito, asociándose al progreso de la enfermedad.⁴⁰ Estos anticuerpos IgG inducen daño al melanocito mediante la activación del complemento de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y se cree que podrían tener un efecto estimulante en la inadecuada sobreexpresión del antígeno leucocitario humano tipo DR (HLA-DR), siendo este un antígeno de superficie celular, la inducción de moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), que al ser aumentada su expresión por medio de IFN- γ , mejora el tráfico de las células T a la piel, y un aumento en la producción de interleucina 8 (IL-8).⁴¹

La presencia de las células T en la patogénesis del vitiligo se ve marcada por la inflamación perilesional ocasionada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Zonas con aumento de CD4⁺ y CD8⁺ se asocian fuertemente con la pérdida de melanocitos, siendo esto uno de los primeros hallazgos de la participación de la inmunidad celular en el vitiligo, en donde los linfocitos T CD8⁺ son los responsables de la muerte de los melanocitos.⁴¹⁻⁴³ Las células T son guiadas para su migración por las quimiocinas, proteínas pequeñas que promueven la quimiotaxis. En pacientes con vitiligo, diferentes quimiocinas dependientes de IFN- γ se sobreexpresan en la piel y sangre. El IFN- γ regula positivamente la expresión del receptor CXCR3 y sus respectivas quimiocinas: CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (Figura 2).⁴⁴ Una gran variedad de moléculas pequeñas y anticuerpos han sido diseñados para antagonizar a los receptores de INF- γ y al receptor a quimiocinas CXCR3. Un ejemplo de esto es AMG-487, un tratamiento específico para CXCR3, el cual llegó hasta ensayos clínicos de fase 2, pero fue terminada su investigación debido a su falta de eficacia.⁴⁵⁻⁴⁷ En estudios recientes, se reportó que CXCL10 se encuentra en mayor concentración en pacientes que padecen de

vitiligo y se asoció a la actividad de la enfermedad, sugiriéndolo como un biomarcador de la enfermedad y un medidor del avance del tratamiento.⁴⁸

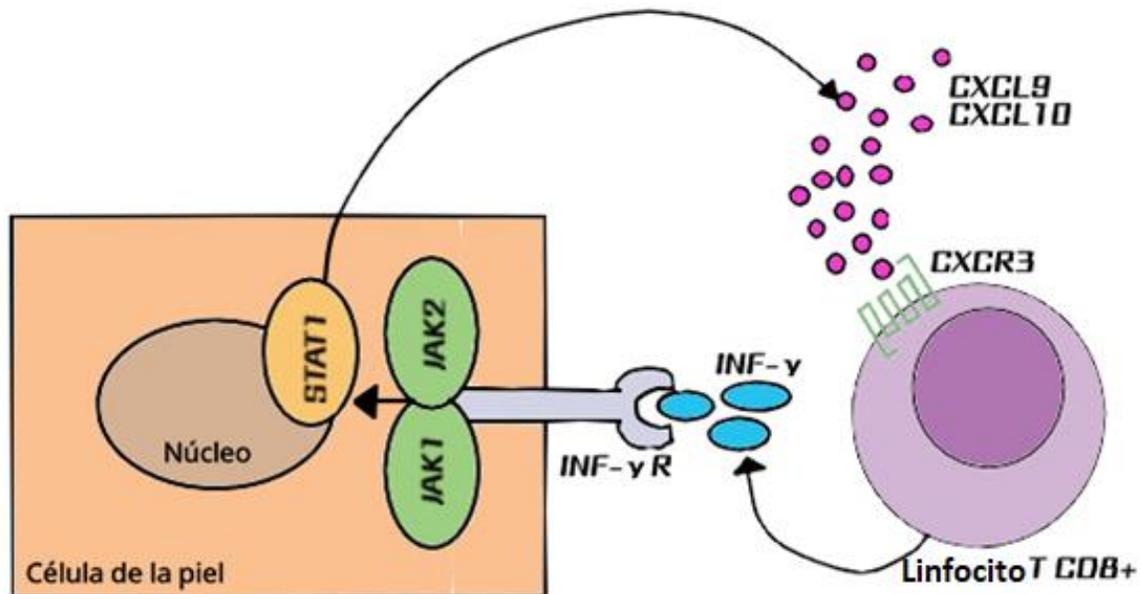


Figura 2. Comunicación celular entre un linfocito T CD8⁺ y una célula de la piel.

La autoinmunidad del vitiligo es impulsada por la vía de señalización de citoquinas INF-γ-CXCL10. Las células T CD8⁺ específicas de los melanocitos activados secretan INF-γ, que envían señales a través de su receptor y activan JAK1, JAK2 y STAT1. Induciendo la producción de CXCL9 y CXCL10 que envían señales a través de su receptor para reclutar más células T autorreactivas en la epidermis, provocando la destrucción generalizada del melanocito.⁴⁶

2.4.1.1. Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos fueron identificados como la población de mayor importancia en el vitiligo, debido a que son los responsables de la destrucción del melanocito pues promueven la apoptosis mediada por granzimas y perforinas. Algunas quimiocinas actúan como una señal temprana para estas células T autorreactivas, estimulando la quimiotaxis de los linfocitos para localizar a los melanocitos estresados o dañados. El estímulo de CXCR3 por sus quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 promueven la movilización de estos linfocitos.⁴⁶

2.5. Tratamiento

Los tratamientos médicos del vitiligo son enfocados primordialmente a repigmentar las lesiones desprovistas de melanina, y sólo algunos cuantos se enfocan en los componentes autoinmunes de la enfermedad, como lo son inmunosupresores, aunque también son conocidos medicamentos que son antioxidantes tópicos u orales que son capaces de reestablecer el estrés oxidativo, promoviendo la regeneración del melanocito (como extractos alcohólicos de placenta).⁴⁹ Algunos tratamientos comunes son el uso de corticosteroides tópicos e inhibidores de la calcineurina (la cual provoca la desfosforilación del NFAT, Factor de Activación Nuclear de las Células T, facilitando su entrada al núcleo, activando a los linfocitos T⁵⁰) resultan efectivos y pueden inducir una repigmentación en la piel.^{16,17}

Las fototerapias como el uso de luz ultravioleta para tratar este tipo de enfermedades convierten compuestos de tipo psoraleno en compuestos reactivos de DNA que ejercen las 2 acciones deseadas para el tratamiento del vitiligo: la supresión de la función inmune y estimulación de la proliferación de los melanocitos y pigmentación.⁵¹ Algunas desventajas a este tipo de tratamientos es que son necesarias varias visitas al dermatólogo y otros tratamientos dermatológicos para poder surtir efecto, aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer de piel de tipo no melanoma y únicamente sirven como tratamientos a corto plazo, pues el 40% de los pacientes inducidos a este tipo de tratamientos suelen recaer tras la interrupción de este.¹⁸

Los tratamientos de vitiligo han presentado moderada eficacia pues algunos de sus mecanismos de acción aún no son esclarecidos, por sus efectos pleiotrópicos en múltiples tejidos y también por el limitado conocimiento sobre la enfermedad.

Algunos de los tratamientos potenciales más nuevos son enfocados a antagonizar al INF- γ o la vía de señalización de INF- γ , incluyendo JAK1, JAK2, STAT1, CXCL10 o sus receptores (Figura 3).^{18,52}

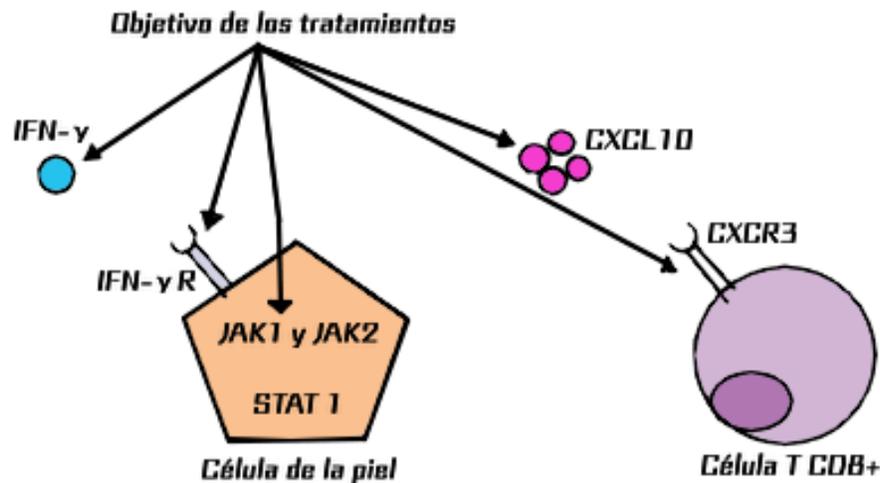


Figura 3. Objetivo de potenciales tratamientos para el vitiligo.

La vía de señalización del IFN- γ es central para la patogénesis del vitiligo y puede servir para el desarrollo de nuevos medicamentos. IFN- γ se expresa en lesiones de vitiligo y se ha informado que se requiere para vitiligo en múltiples modelos de enfermedad en ratones. Las señales de IFN- γ y a través del receptor de IFN- γ , que a su vez activa JAK 1 y 2, así como STAT1, e induce la producción y secreción de CXCL10.²²

2.6. Blancos de interés en vitiligo

2.6.1. Relevancia de receptores a quimiocinas en vitiligo

La quimiotaxis se define como la movilidad de las células inmunes a un sitio de infección o un sitio dañado, coordinada principalmente por pequeñas proteínas denominadas como quimiocinas, de las cuales se conocen hasta ahora 47 quimiocinas divididas en varios grupos: CC, CXC, C y CX₃C, siendo las CC y CXC los grupos más grandes, y 19 receptores de quimiocinas ⁵³. En estudios relacionados con el vitiligo, se ha reportado una sobreexpresión de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL16 involucradas en la quimiotaxis de linfocitos T CD8⁺ melanocitotóxicos. Este fenómeno de sobreexpresión de quimiocinas se acompaña con la sobreexpresión de sus respectivos receptores CXCR3 y CXCR6 en piel de pacientes con vitiligo comparado con pacientes sanos.^{46,52,54}

El receptor de quimiocinas CXCR3 es un receptor de 7 pasos transmembranales clasificado como un receptor de tipo C-X-C ELR-negativo, basado en la estructura de sus quimiocinas ligando, debido a que las quimiocinas que no tienen la triada de aminoácidos ELR tienden a ser solo quimioatrayentes, a diferencia de las quimiocinas C-X-C ELR-positivo que atraen neutrófilos y promueven la angiogénesis. Es un receptor acoplado a una proteína G (GPCR) y cuenta con 3 isoformas obtenidas por empalme alternativo, CXCR3A (368 aminoácidos,

a.a.), CXCR3B (415 a.a.) y CXCR3-alt (267 a.a.). Un grupo heterogéneo de linfocitos T efectores ya sean células T-auxiliares (Th) CD4⁺ y linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ muestran un aumento en la expresión de CXCR3 en contraste con sus precursores; sin embargo, entre las diferentes células Th CXCR3 marca particularmente a las células Th1, en lugar de las células Th2 y Th17, donde las Th1 se encargan de patógenos intracelulares y son las productoras de INF- γ como su citocina característica⁷, las Th2 se encargan en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos (helmintos) y las Th17 desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra crecimiento celular y hongos.⁶ Un gran número de estudios han reportado una sobreexpresión del receptor CXCR3 y sus ligandos en diferentes enfermedades como cáncer de mama, cáncer de pulmón, leucemia, artritis inflamatoria, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, entre otros.⁸

2.6.2. Antagonismo de receptor de quimiocinas CXCR3

Una alternativa viable para el tratamiento del vitiligo es la inhibición de la quimiotaxis, antagonizando al receptor CXCR3, evitando la presencia de los linfocitos T CD8⁺ en la piel.⁴⁶ Muchos estudios con quimiocinas y mutantes de receptores han demostrado que la unión y activación del receptor se puede describir en un modelo “de 2 etapas”. En la primera etapa, la quimiocina se une a la región *N*-terminal del receptor, que comprende el segmento entre el segundo residuo de cisteína y la hélice β , llamada *N-loop*, que contribuye a la unión y es responsable del reconocimiento del receptor. En la segunda etapa algunos residuos del *N*-terminal de la quimiocina se unen a un segundo sitio del receptor y lo activan, provocando cambios estructurales en el receptor por la interacción con los *loops* extracelulares (ECL) y los segmentos transmembranales (TMs). Otros autores indican que el primer paso comprende la unión de la quimiocina, la orientación hacia los ECLs, provocando los cambios conformacionales, debido a la interacción con los TMs y como segundo paso la separación del complejo $\beta\gamma$ de la subunidad $\alpha_{i/o}$. Los residuos 22-42 corresponden al segmento de CXCR3 que se sabe que contiene los residuos que se unen a la región *N*-terminal de las quimiocinas. Antagonistas sintéticos de CXCR3 han sido reportados en años recientes; un ejemplo de estos antagonistas sintéticos es ACT-672125, un antagonista específico de CXCR3, el cual posee un núcleo de benzimidazol-tiazol y ha inhibido el reclutamiento de células T que expresan CXCR3 en un modelo de prueba de mecanismo de inflamación pulmonar dependiente de dosis, mostrando buenas propiedades fisicoquímicas y perfil de seguridad, lo cual sugiere que posee un buen potencial terapéutico antagonista para enfermedades autoinmunes.⁹ Lamentablemente, los estudios para entender el mecanismo de antagonismo y la forma natural de unión de ligandos han sido

limitadas, debido a que la estructura cristalográfica de CXCR3 no ha sido resuelta experimentalmente.⁵⁵⁻⁵⁸

2.6.2.1. Receptor a quimiocinas CXCR3A

CXCR3A es la isoforma más abundante del receptor CXCR3, constituido por 368 residuos, codificado por sólo dos exones, separados por un solo intrón, y se acopla a una proteína $G\alpha_{i/o}$ que media la señalización promigratoria y proliferativa, aumentando los niveles de calcio intracelular y suprimiendo la producción de AMPc. Este receptor está primordialmente expresado en linfocitos T activados, pero la expresión también se observa en una variedad de otros tipos de células, incluidas las células dendríticas, las *natural killers*, las células B y los macrófagos. Interactúa con CXCL9, CXCL10 y CXCL11, siendo mayor su afinidad a CXCL11, seguida de CXCL10 y CXCL9.¹⁰ El receptor de quimiocinas CXCR3A se ha encontrado sobreexpresado en diferentes enfermedades, de naturaleza crónico-inflamatoria y en algunos tipos de cáncer, como cáncer colorrectal, carcinoma oral de células escamosas, entre otros.^[46,47] Estas apariciones resultan ser mucho mayores en los tejidos cancerosos que en tejido normal, a diferencia de CXCR3B que se muestra en mayores cantidades de tejido normal.¹⁰

Recientemente se reportó, de manera experimental, la activación de CXCR3A en complejo con sus 3 quimiocinas, se encontraron los residuos relevantes en la interacción y actividad entre CXCR3A y sus quimiocinas, los cuales se presentan en la tabla 1. Adicionalmente, otros residuos fueron reportados como importantes en la activación del receptor; N132-D186 y N134-W268 permitieron la estabilización del estado activo del receptor pues promovieron la interacción entre el residuo R149 de CXCR3A y R193 de la subunidad α necesaria para la activación de la GP. Todo esto fue reportado gracias al uso de técnicas computacionales como modelado por homología y dinámica molecular de tipo *coarse grained*, en donde se construyó un complejo CXCR3A-GP-quimiocina, sin embargo, la falta de ATP y Mg^{2+} , en la proteína G (GP) imposibilitó la activación de la proteína G, mediante la separación del complejo $\beta\gamma$ de la subunidad α . Las rotaciones de los segmentos transmembranales de CXCR3A mostraron cambios significativos a partir de los 100 ns del segundo ciclo de simulación pues CXCL10 alcanzó un equilibrio en términos de distancia desde el centro de masa de CXCR3A y a los 175 ns comenzó la separación del complejo $\beta\gamma$ de la subunidad $\alpha_{i/o}$ de la proteína G; estas rotaciones nos permite observar los movimientos rotacionales de la proteína en interacción con CXCL10, pues nos da una idea de los cambios conformacionales que son provocados, pues al ser comparados con una dinámica del receptor solo encontramos las claras diferencias en los movimientos

rotacionales además de las diferentes interacciones entre los segmentos transmembranales, los cuales indican en qué estado se encuentra el receptor. Este resultado confirmó que CXCR3A presentó un estado metaactivo con la orientación de CXCL10 hacia los *loops* extracelulares y la rotación de los segmentos transmembrana y, cuando se acopló con la proteína $G_{i/o}$ funcional, promovió los cambios conformacionales en la subunidad α que permitieron la separación del complejo $\beta\gamma$, estabilizando el estado activo a través de las interacciones entre N132-D186 y N134-W268.⁵⁷

Tabla 1. Aminoácidos relevantes para las interacciones entre CXCR3 y sus quimiocinas.⁵⁷

| RESIDUOS | OBSERVACIÓN |
|-----------------------|---|
| RESIDUOS 1-16 R216 | Relevantes para la interacción entre CXCR3A y sus quimiocinas Fundamentales para la quimiotaxis y la movilización de Ca^{+2} pero no en la unión a quimiocinas |
| Y27, Y28 | La sulfatación entre estos residuos es necesaria para la interacción con las quimiocinas |
| N197, N212 | Esencial para la unión con CXCL10 |
| D112, D278 | Relevantes para la unión con las quimiocinas, pero solo CXCL10 y CXCL11 tienen una influencia en su actividad |
| D282, E293 | Influencia en la actividad de CXCL10 y CXCL9 y en la interacción con CXCL11 |

2.6.2.2. Receptor a quimiocinas CXCR3B

CXCR3B está constituido por 415 residuos, generado por empalme alternativo en el extremo 5' del segundo exón. Además, la secuencia insertada comprende un codón de inicio alternativo que da como resultado la pérdida de los cuatro residuos amino-terminal (NH_2 -T) codificados por el primer exón, que son reemplazados por una nueva cola NH_2 -T de 51 aminoácidos. En estudios previos de cáncer de mama se mostró evidencia que sugiere que la señal mediada por CXCR3B es proapoptótica.^{12,13} En contraste con CXCR3A, la cual está unida a la subunidad $G\alpha_i$, CXCR3B se encuentra unido a $G\alpha_s$, iniciando una señalización opuesta, aumentando los niveles de AMPc y disminuyendo los niveles de calcio.^{8,14} CXCR3B es menos abundante que CXCR3A y cuenta con los mismos ligandos naturales, las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, presentando una mayor afinidad a CXCL10. Esta isoforma se sobreexpresa en los melanocitos en estados iniciales del vitiligo. La estimulación de CXCR3B por medio de CXCL10 promueve apoptosis en los melanocitos y la subsecuente activación del sistema inmune adaptativo y de memoria¹⁵. Han sido reportados 894 ligandos antagonistas del receptor de quimiocinas CXCR3, en la base pública de datos ZINC, obtenidos en su mayoría de procesos de *High Throughput Screening* (HTS) y optimización de estructuras;⁵⁷ sin embargo, hasta ahora no se ha

reportado un antagonista específico para CXCR3B y se desconoce la especificidad de los antagonistas reportados hacia alguna de las isoformas.

2.7. Diseño de fármacos asistido por computadora

La estructura tridimensional de CXCR3 no ha sido resuelta por técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía de rayos X o crio-microscopía electrónica (Crio-EM), para ninguna de sus 3 isoformas. Las técnicas computacionales, como el modelado por homología, son una opción viable para predecir su estructura tridimensional y estudiar las uniones con su quimiocina natural CXCL10, por medio de acoplamiento molecular (*docking*) y observar los residuos relevantes en las interacciones de los complejos CXCR3A-CXCL10 y CXCR3B-CXCL10, mediante simulaciones de dinámica molecular y de esta forma generar información útil para el diseño de nuevas moléculas que puedan antagonizar de manera específica a los receptores CXCR3A y CXCR3B.^{57,58}

2.7.1. Modelado por homología

El modelado por homología es un método utilizado para la predicción de la estructura tridimensional de proteínas basándose en la secuencia de la proteína y su similitud con una o más estructuras de proteínas similares; es considerado el método computacional de predicción más acertado. La base para el modelado por homología son dos consideraciones principales: primero, la estructura tridimensional de la proteína está determinada particularmente por su secuencia de aminoácidos; en segundo lugar, la estructura de las proteínas está más conservada y el cambio ocurre a un ritmo mucho más lento en relación con la secuencia durante la evolución, por tanto, secuencias con alta similitud de secuencia se pliegan en estructuras similares.⁵⁹ A partir de estos pasos se emplea una medición en porcentaje para conocer qué tan fiables serán los resultados, cuando la identidad de secuencia está por debajo del 30%, el alineamiento se vuelve sumamente difícil. Cuando la identidad de secuencia es de entre 30-40%, obtener un alineamiento correcto se vuelve difícil y cuando está por arriba de 40% se considera un buen porcentaje de identidad, pues al haber menor variación se puede decir que hay mayor seguridad.⁶⁰

El modelado por homología tiene un procedimiento para asegurar un plegamiento correcto de las proteínas: el primer paso es la identificación y selección de plantillas, donde se seleccionará la secuencia plantilla en bases de datos como PDB o similares. Es necesario que en la selección de estructuras se utilicen las que tengan mayor nivel de similitud entre la secuencia plantilla y la secuencia objetivo. Existen herramientas populares para buscar plantillas elegibles para la secuencia objetivo con diferentes enfoques. Entre ellas, la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) es efectiva, siempre y

cuando la secuencia problema cuente con una similitud mayor a 30%, ya que bajo de ese porcentaje se pueden obtener resultados erróneos.⁶⁰ El segundo paso, una vez seleccionadas los mejores alineamientos, se realiza la corrección de éstas en caso de que sea necesario.^{60,61} En el tercer paso se realiza la construcción del modelo; esto se realiza con la ayuda de servidores que proporcionan predicción de estructuras de proteínas; el servidor que se clasificó como el servidor número 1 para la predicción de la estructura de proteínas en experimentos recientes CASP7, CASP8, CASP9, CASP10, CASP11, CASP12, CASP13 y CASP14 en toda la comunidad es I-TASSER.⁶²

2.7.2. Simulaciones de dinámica molecular (MD)

La dinámica molecular es un tipo de simulación computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, una herramienta muy común utilizada para dilucidar una aproximación de cómo interactúan ciertas estructuras biomoleculares en un entorno definido y por un tiempo definido, siendo un método eficiente del estudio del movimiento físico de átomos y moléculas. Con el uso de la MD, se pueden calcular diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema como la energía libre, entropía, solubilidad, viscosidad, presión, temperaturas de cambio de fase, y en sistemas biológicos, medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus dianas biomoleculares o receptores, e incluso describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones, por mencionar algunas de sus capacidades.⁶³ La MD cuenta con 3 áreas de aplicación muy importantes: la primera permite dar movimiento a las estructuras biomoleculares, proporcionando información sobre su dinámica natural en diferentes tiempos, la segunda proporciona propiedades moleculares, pues al realizarla en una estructura por un determinado tiempo se obtienen sus propiedades promediadas en un tiempo definido, esto se utiliza normalmente para calcular las propiedades de algunos fluidos, las diferencias de energía libre o para procesos químicos como la unión a ligandos, y por último, la tercera es el poder explorar qué conformaciones de una molécula son térmicamente accesibles. Esto último se usa para determinar de una forma más realista la unión a ligandos.^{64,65} Las diferentes etapas de la dinámica molecular se pueden resumir en la tabla 2.

Tabla 2. Etapas de una simulación de dinámica molecular.⁶³

| | |
|---|--|
| <u>Preparación del sistema</u> Selección de muestra (N, CI, CE) | Se establece o elige la configuración inicial (CI) a utilizar compuesta de N átomos y se definen las condiciones de equilibrio (CE). |
| <u>Minimización y Equilibrio</u> Preparación de muestras (Objetivo, P, T) | Mediante diferentes esquemas o ensambles de simulación (microcanónico, canónico, isotérmico-isobárico), se lleva el sistema al equilibrio donde la energía permanece casi constante. Dependiendo del esquema a utilizar, se pueden definir condiciones constantes de energía, presión y/o temperatura |
| <u>Simulación MD</u> Propiedad para calcular (L pasos de ejecución, <i>runs</i>) | Se define el tiempo de ejecución ("L" pasos de ejecución, <i>runs</i>). Este es el paso que requiere el mayor tiempo, pues puede ir de pocos picosegundos a microsegundos (horas a semanas de uso de máquina). Se realiza el cálculo de fuerzas del sistema con lo que se pueden obtener las propiedades fisicoquímicas de interés. |
| <u>Resultado</u> Análisis de datos (Propiedad calculada) | Finalmente, se analizan los resultados y se obtiene la información deseada. Dependiendo del paquete utilizado, se puede hacer el cálculo de muchos parámetros. Además, se puede analizar la trayectoria o comportamiento del sistema (animación o película) por medio de visualizadores moleculares con interfaz gráfica. |

La dinámica molecular puede tener algunas variantes como la dinámica molecular *Coarse Grained* y la dinámica *All-atom*. En la dinámica *Coarse Grained* todos los residuos son tomados en cuenta como pequeñas partículas y proporcionan un enfoque prometedor para aumentar la escala de tiempo de las simulaciones biomoleculares.⁶⁶ En cambio las dinámicas *All-atom*, cada átomo es una pequeña partícula; este tipo de dinámica es utilizada para detallar las interacciones o estructuras de membranas o proteínas de manera más detallada.⁶⁷

2.7.3. Acoplamiento molecular (*docking*) proteína-proteína

El *docking* proteína-proteína tiene la tarea de predecir la estructura 3D de un complejo proteína-proteína a partir de sus estructuras componentes; es útil en ausencia de una estructura experimental para proporcionar información sobre la función molecular de las proteínas, como la base para el reconocimiento, la afinidad y la especificidad.⁶⁸ Los algoritmos de acoplamiento actuales emplean una gama de estrategias eficientes de búsqueda y puntuación basadas en energía, que incluyen correlaciones de transformada rápida de Fourier (FFT), *hashing* geométrico y técnicas de Monte Carlo (MC), entre otras. Estos enfoques generalmente producen una lista relativamente pequeña de hasta unos pocos miles de orientaciones de acoplamiento posibles, entre las que a menudo se observa un modo de enlace casi nativo.⁶⁹

El servidor ClusPro es utilizado para llevar a cabo *docking* proteína-proteína y realiza tres pasos computacionales de la siguiente manera: (1) acoplamiento de cuerpo rígido, mediante muestreo de miles de millones de conformaciones, (2) agrupación basada en la desviación cuadrática media (RMSD) de las 1000 estructuras de energía más baja generadas para encontrar los grupos más grandes que representarán los modelos más probables del complejo y (3) refinamiento de estructuras seleccionadas usando minimización de energía.⁷⁰

Con el *docking* proteína-proteína aplicado para el análisis del receptor CXCR3A y CXCR3B con su quimiocina CXCL10 tendríamos una idea de cómo se comporta en su activación y así obtener información útil para diseños de moléculas futuras.

2.7.4. Acoplamiento molecular proteína-ligando.

El *docking* molecular es una herramienta clave para el descubrimiento de nuevos fármacos y aplicaciones para el modelado molecular, además de ser útil para encontrar nuevos blancos de fármacos ya conocidos. El acoplamiento proteína-ligando tiene como objetivo explorar los modos de unión predominantes de un ligando cuando se une a una estructura tridimensional conocida. En el acoplamiento basado en la estructura de las proteínas se generan decenas de miles de posibles poses de ligando; las posibles poses son evaluadas por una función de puntuación que va guiando y determinando las poses del ligando. Estas funciones de puntuación tienen 3 funciones principales: el primero es determinar el modo y sitio de unión de un ligando y una proteína, el segundo predice la afinidad absoluta entre la proteína y el ligando con el fin de optimizarlo y el tercero es el cribado virtual donde se identifican los posibles fármacos precursores para una proteína objetivo mediante la búsqueda en una base de datos.⁷¹

La búsqueda de alternativas para el tratamiento del vitiligo es de gran importancia debido a que no todos los tratamientos son 100% efectivos, adicionalmente, porque no a todas las personas les sirven los mismos.¹⁷ El uso de las técnicas computacionales antes mencionadas permitirá el desarrollo de nuevas moléculas que puedan servir como tratamiento para el vitiligo.

3. Justificación

El vitiligo es una enfermedad hipopigmentaria de origen autoinmune de la piel, caracterizada por máculas blancas, provocada por la falta de melanocitos, que afecta a 70 millones de personas a nivel mundial sin importar etnia, color de piel o sexo.¹⁸ En México afecta entre el 2-4% de todos los pacientes dermatológicos y está entre el tercer y quinto lugar en enfermedades dermatológicas.¹⁹ El vitiligo disminuye la calidad de vida de las personas que la padecen, pues se ven afectados tanto psicológica como socialmente. Adicionalmente, se ha demostrado que existe una relación de depresión y ansiedad en las personas que la padecen.²⁰

La búsqueda de alternativas para el tratamiento del vitiligo es de gran importancia debido a que no todos son 100% efectivos, también porque no a todas las personas les sirven los mismos tratamientos.¹⁷ El receptor a quimiocinas CXCR3 cuenta con 3 isoformas CXCR3A, CXCR3B y CXCR3-alt, de las cuales las primeras 2 se han mostrado sobreexpresadas en pacientes con vitiligo, CXCR3A en etapas avanzadas de vitiligo y CXCR3B en etapas tempranas de vitiligo.¹² Sin embargo, las estructuras tridimensionales de los receptores a quimiocinas CXCR3, para ninguna de sus isoformas, no han sido resueltas por técnicas como RMN, Rayos X o crio-EM; por lo cual, estudios computacionales sobre la activación de los receptores de interés y el diseño asistido por computadora, permitirá el diseño de nuevas moléculas que antagonicen específicamente los receptores CXCR3A y CXCR3B, los cuales serán potencialmente útiles para el tratamiento del vitiligo en las fases tempranas, antagonizando CXCR3 y en las fases tardías de la enfermedad, antagonizando CXCR3A.

4. Hipótesis

El estudio computacional de la interacción de los receptores CXCR3A y CXCR3B con la quimiocina CXCL10, por medio de simulaciones de dinámica molecular, permitirá obtener información de los cambios conformacionales e interacciones que determinan estados activos e inactivos de los receptores, información que será utilizada para el diseño de nuevos compuestos con posible efecto antagonista.

5. Objetivo general

Describir los cambios conformacionales de los receptores CXCR3A y CXCR3B por la unión de la quimiocina CXCL10, mediante modelado molecular, para diseñar nuevas moléculas con potencial efecto antagonista.

6. Objetivos particulares

6.1. Estudiar, por métodos computacionales, la interacción de CXCR3A y CXCR3B con CXCL10.

- Realizar el modelado por homología de CXCR3B y CXCL10.
- Describir los cambios conformacionales relacionados con la activación de CXCR3A y CXCR3B en complejo con CXCL10, mediante acoplamiento molecular proteína-proteína y simulaciones de dinámica molecular.

7. Metodología

7.1. Estudio computacional de la interacción de CXCR3A y CXCR3B con CXCL10.

Se construyeron complejos para 2 isoformas del receptor CXCR3, CXCR3A-CXCL10 y CXCR3B-CXCL10, además de que se realizaron los mismos análisis para determinar la activación de los receptores.

7.1.1. Modelado por homología de CXCR3B y CXCL10.

La secuencia primaria del receptor CXCR3B y la quimiocina CXCL10 fueron obtenidos de la base de datos de UniProt ⁷² (códigos P49682-2 y P02778, respectivamente). La estructura tridimensional de CXCL10 fue obtenida de la base de datos de *Protein Data Bank* (PDB) con el código 1LV.⁵⁵ La secuencia de aminoácidos de CXCR3B se ingresó al servidor de GPCR-I-TASSER ⁷³ y CXCL10 al módulo general de I-TASSER ⁷⁴ para la construcción de su modelo por homología. El servidor I-TASSER se ha desarrollado para generar predicciones estructurales de proteínas en 3D de longitud completa; cada consulta incluye hasta cinco modelos completos, la puntuación de confianza, la puntuación TM estimada y RMSD, y la desviación estándar de las estimaciones.⁷⁴ GPCR-I-TASSER puede explotar plantillas de homología distante y restricciones espaciales de baja resolución, pero más fácil de adquirir datos experimentales para ayudar al modelado de estructuras GPCR de alta resolución.⁷³ La plantilla para el modelado por homología fue seleccionada por el servidor I-TASSER, siendo el receptor a angiotensina II tipo 2 (código UniProt: P50052, código PDB: 5UNF) y el porcentaje de identidad de secuencia (28.74%), calculado en el servidor BLAST.⁷⁵ Se utilizó el modelo por homología de CXCR3A, obtenido de estudios anteriores por el laboratorio de Diseño Asistido por Computadoras y Síntesis de Fármacos (DACSIF) de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

7.1.2. Descripción los cambios conformacionales de CXCR3A y CXCR3B en complejo con CXCL10, mediante acoplamiento molecular proteína-proteína y simulaciones de dinámica molecular.

7.1.2.1. Construcción de los complejos CXCR3A-CXCL10 y CXCR3B-CXCL10

Para construir el complejo CXCR3B-quimiocina se realizó un acoplamiento molecular de manera libre, utilizando el servidor ClusPro;⁷⁰ se utilizó la estructura representativa del clúster más numeroso y la estructura representativa obtenida de las simulaciones de

dinámica molecular para CXCR3B y CXCL10. En el servidor ClusPro no se consideró ninguna restricción.

Para construir el complejo CXCR3A-quimiocina se realizó un acoplamiento molecular de manera libre, utilizando el servidor ClusPro⁷⁰ y se utilizaron los mismos estándares de selección que los usados con el complejo CXCR3B-CXCL10.

7.1.2.2. Preparación de los sistemas para las simulaciones de dinámica molecular Coarse-Grained (CG-MD)

La preparación de los sistemas (Complejo CXCR3B-CXCL10 y CXCR3B) para simulaciones MD se llevó a cabo en el servidor web CHARMM-GUI ⁷⁶ en el módulo *Martini maker*⁷⁷, utilizando el campo de fuerza Martin2.2P en un ensamble NPT a 1 atm de presión y 310.15 K de temperatura usando el baróstato Parinello-Rahman y termostato que acopla la temperatura usando la velocidad rescalándolo con un término estocástico (termostato Bussi-Donadio-Parrinello), con un corte de interacciones Coulombicas de 1.1nm y para interacciones VanDerWaals de 1.1nm.

El sistema se construyó con una membrana de POPC, un modelo de agua polarizable (PW), y se agregaron los iones correspondientes para neutralizar el sistema (NaCl, 0.15 M). Los sistemas se sometieron a 5000 pasos de minimización, seguido del esquema de 6 pasos de equilibrio, mediante la restricción de las posiciones de las partículas correspondientes al *Backbone* de la proteína y cabezas polares de los lípidos de la membrana mediante la reducción de las constantes de fuerza, sugeridas por el servidor CHARMM-GUI, antes de realizar las simulaciones de producción de 1 μ s con un tiempo de integración de 2 fs. Todas las dinámicas se realizaron por quintuplicado para seleccionar la más representativa.

La preparación de los sistemas (Complejo CXCR3A-CXCL10 y CXCR3A) para simulaciones MD se llevaron a cabo en el servidor web CHARMM-GUI ⁷⁶ en el módulo *Martini maker*, ⁷⁷ utilizando el mismo campo de fuerza que en el complejo CXCR3B-CXCL10, además de los 5000 pasos de minimización, seguido del esquema de 6 pasos de equilibrio, mediante la reducción de las constantes de fuerza antes de realizar las simulaciones de producción de 1 μ s.

7.1.2.3. Simulaciones CG-MD

Todas las dinámicas se realizaron por quintuplicado para seleccionar las estructuras más representativas.

Una vez obtenido el complejo CXCR3A-CXCL10 y CXCR3A solo, se realizó una simulación CG-MD de 1 μ s. Se obtuvieron las estructuras del complejo a cada 100 ns de simulación

CG-MD para los análisis de rotación de ángulos e interacciones entre segmentos transmembranales, tanto del complejo CXCR3B-CXCL10 como de CXCR3B sin quimiocina.

Una vez que se obtengan los complejos CXCR3B-CXCL10 se realizaron una simulación CG-MD de 1 μ s. Se obtuvieron las estructuras del complejo a cada 100 ns de simulación CG-MD para los análisis de rotación de ángulos e interacciones entre segmentos transmembranales, tanto del complejo CXCR3B-CXCL10 como de CXCR3B sin quimiocina. Estas estructuras se convirtieron a una topología *all-atom* en el módulo *All-Atom Converter* de *Martini Maker* en CHARMM-GUI, agregando la fosforilación en Tyr27 y Tyr29 para CXCR3A solo y con quimiocina, debido a que Tyr27 y Tyr 29 son residuos modificados con sulfotirosina pero CHARMM-GUI no contiene la parametrización de residuos sulfatados en una topología CG y, debido a la similitud en la química entorno de la fosforilación, decidimos agregar estas modificaciones para simular ese entorno al convertirlos a una topología *all atom* y utilizando la estructura inicial, obtenida después de los procesos de minimización y equilibrio (F0) como control.

Los análisis posteriores se realizaron sobre las estructuras más representativas para cada 100 ns, la estructura inicial, obtenida después de los procesos de minimización y equilibrio como control y el primer nanosegundo de interacción (F01 y F0-F10) que se obtuvieron utilizando el módulo de análisis de estructura promedio de la versión académica del programa Schrödinger Maestro, el cual utilizó un método de ponderación uniforme y superpuso todas las estructuras a una sola entrada, considerando átomos pesados para RMSD y verificando la simetría en comparaciones de RMSD. Luego, este módulo seleccionó como estructura representativa aquella con el RMSD más pequeño de la estructura promedio. La ponderación uniforme utilizó el mismo peso para cada estructura y verificó la simetría local en la conectividad (como una orientación de anillo), lo que podría reducir el RMSD, y utilizó el valor de RMSD más bajo. Posteriormente se realizó el análisis de las rotaciones de segmentos transmembrana mediante la versión académica del programa PYMOL.

Los análisis de rotación se realizaron utilizando un script Python gratuito del eje de rotación "draw_rotation_axis.py" en el repositorio oficial de scripts PyMOL (<https://pymolwiki.org/index.php/PyMol-script-repo>). El script calculó el valor del eje de rotación utilizando F0 como estructura de referencia.

Se realizaron cálculos de RMSD de CXCR3B sin quimiocina, CXCR3A sin quimiocina, CXCR3B-CXCL10, CXCR3A-CXCL10, bucles intracelulares (ICL), bucles extracelulares (ECL), amino terminal (NH₂T), carbonilo terminal (COOHT) y TM para cada uno de los Simulaciones generadas por computadora. Todas las gráficas se construyeron con R utilizando las bibliotecas ggplot2, reshape2, svglite y *peptides*, utilizando la mediana del RMSD de las 5 simulaciones CG de CXCR3B sin quimiocina, CXCR3A sin quimiocina, CXCR3B-CXCL10 y CXCR3A-CXCL10, así como la mediana de las diferencias del RMSF de los complejos CXCR3-CXCL10 con el receptor solo.

8. Resultados y discusión

8.1. Modelado por homología de CXCR3B y CXCL10

El servidor público I-TASSER construyó 5 modelos de CXCR3B utilizando el receptor de angiotensina 2 tipo II como plantilla con un porcentaje de identidad del 28.74 % calculado en el servidor BLAST⁸⁰. I-TASSER genera los modelos tridimensionales a partir del ensamblaje de fragmentos de secuencias de aminoácidos extraídos de la plantilla proporcionada, luego compara los modelos estructurales con proteínas funcionales conocidas de la base de datos y selecciona la mejor. I-TASSER no descarta ningún aminoácido en la creación de los modelos 3D debido al plegamiento ab-initio basado en algoritmos Monte Carlo de simulación de intercambio de réplicas que I-TASSER aplica a los segmentos estructurales del modelo^{57,58,81}. El mejor modelo es seleccionado por I-TASSER a través de un análisis de *C-score* con un rango de -5 a 2, donde los valores más altos representan un modelo con mayor confianza y el puntaje TM donde un puntaje superior a 0.5 se considera un modelo con una topología correcta⁸². El modelo seleccionado fue el modelo 1 (CXCR3B-M1, Figura 4A) con una puntuación C de -1,4 y una puntuación TM de $0,54 \pm 0,15$. Además, se evaluó la calidad del modelo CXCR3B-M1 utilizando el servidor público MolProbity⁸³ para obtener el diagrama de Ramachandran y observar la calidad del modelo.

El modelo CXCR3B-M1 mostró un porcentaje de residuos en zonas favorables de 84,5%. Cuanto mayor sea el porcentaje de residuos en las regiones favorecidas del diagrama de Ramachandran, mejor será la calidad estereoquímica de los modelos⁸⁴. El modelo I-TASSER de CXCR3B es un modelo aceptable; sin embargo, la región carboxilo terminal (COOHT) estaba orientada hacia la región transmembrana (área coloreada en rojo, Figura 4). Esta orientación, a pesar de no interferir con la unión de CXCR3B y CXCL10, es importante porque es el dominio con el que la proteína G tendría interacción; por lo tanto, aunque la proteína G no se consideró para estos estudios, el COOHT se orientó manualmente para evitar interacciones no naturales con los segmentos transmembrana (Figura 4B).

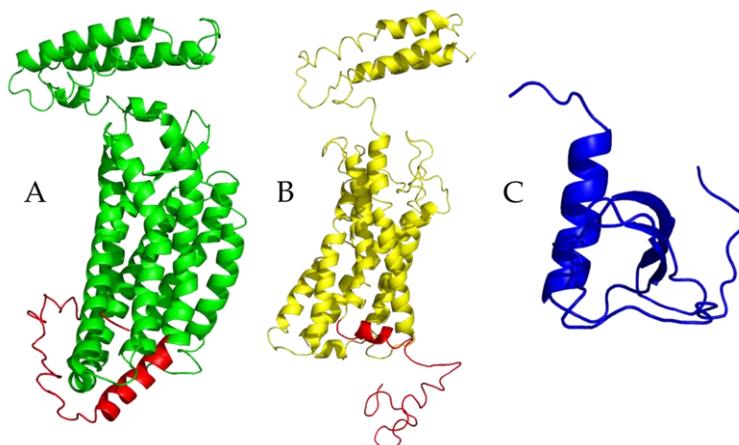


Figura 4. Estructuras de CXCR3B y CXCL10. (A) CXCR3B-M1. COOHT es de color rojo sin reorientación, (B) CXCR3B-M1 con el COOHT reorientado, (C) CXCL10-M1.

Esta nueva conformación se evaluó en MolProbity y se obtuvo un porcentaje de residuos favorecidos del 82,32%. Los diagramas de Ramachandran se presentan en la figura 5 (5A para el modelo anterior al cambio de COOHT y 5B para el modelo con COOHT corregido). Para el caso de CXCL10, I-TASSER produjo 5 modelos utilizando la estructura incompleta presente en el PDB de CXCL10 (código PDB: 1LV9) como plantilla ⁵⁶. El modelo seleccionado fue el modelo 1 (CXCL10-M1, Figura 1C) con un C-score de 0,12 y una puntuación TM de $0,73 \pm 0,11$. Además, la calidad de CXCL10-M1 se evaluó mediante el servidor público MolProbity para obtener el diagrama de Ramachandran (Figura 5C). El modelo CXCL10-M1 mostró un porcentaje de residuos en zonas favorables de 85,33%.

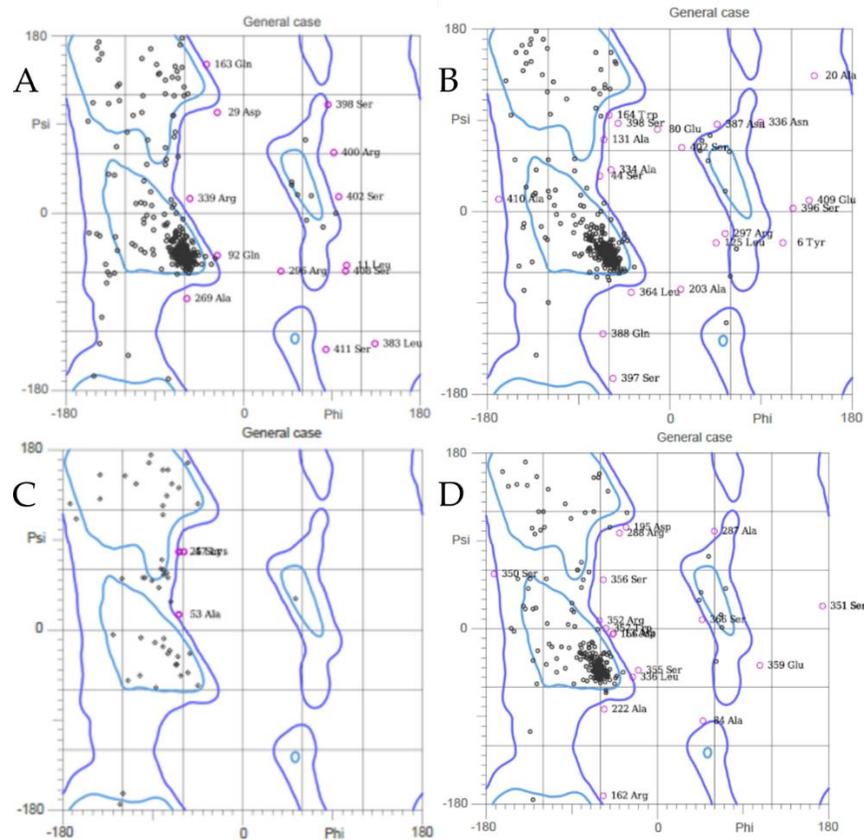


Figura 5. Diagramas de Ramachandran. (A) CXCR3B-M1 (B) CXCR3B reorientado (C) CXCL10 (D) CXCR3A.

La estructura de CXCR3A se obtuvo a partir de un modelo previamente calculado por nuestro grupo, tomando como molde CCR5 (código PDB: 4MBS, cadena A ⁸⁵) con un porcentaje de identidad de secuencia del 36,49%, y porcentaje de residuos favorables del 85,52%, en el diagrama de Ramachandran (Figura 5D) evaluado el servidor público MolProbity ⁵⁷.

CXCR3B y CXCR3A son dos isoformas diferentes debido a la presencia de 47 residuos en el NH₂T de CXCR3B ¹⁵. En el modelo construido por I-TASSER CXCR3B 3 hélices alfa pertenecientes al NH₂T, en cambio, CXCR3A tiene solo 1 hélice alfa. Esta conformación tridimensional del NH₂T en CXCR3B (Figura 6A) puede afectar la forma de unión de las quimioquinas o funcionar como un sitio de unión para ligandos específicos de CXCR3B, mientras que en CXCR3A (Figura 6B), esa área funciona como un sitio de unión para las diferentes quimiocinas, pero es más accesible para cumplir con el segundo paso de activación del receptor a las quimiocinas y facilita la activación en dos pasos de los receptores a las quimiocinas ⁵⁶.

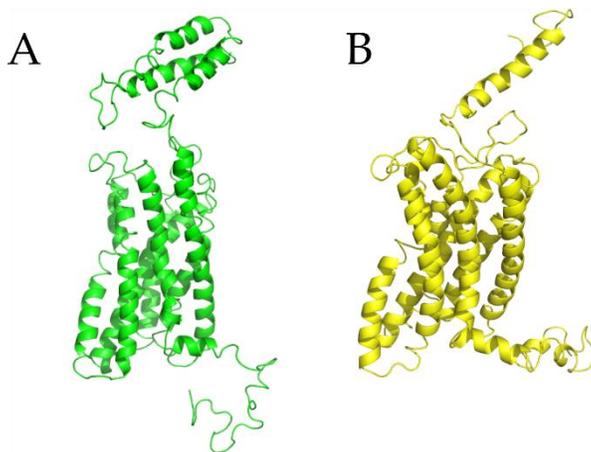


Figura 6. Modelos CXCR3B y CXCR3A. (A) CXCR3B seleccionado (B) CXCR3A-M1

8.2. Construcción de complejos CXCR3B-CXCL10 y CXCR3A-CXCL10

Usando los modelos seleccionados de CXCR3B y CXCL10, así como la estructura de CXCR3A, se realizó el acoplamiento molecular proteína-proteína en el servidor público ClusPro ⁷⁰ para observar las interacciones preliminares y obtener los complejos CXCR3B-CXCL10 y CXCR3A-CXCL10 para simulaciones CG-MD.

8.2.1. Construcción del complejo CXCR3B-CXCL10

Para el acoplamiento de CXCR3B no se agregaron restricciones en el servidor ClusPro, esto con el fin de observar de forma natural las interacciones del receptor con la quimiocina, considerando que no hay evidencia de que las modificaciones postraduccionales presentes en CXCR3A también se encuentren en CXCR3B, en el caso de CXCR3A Tyr27 y Tyr29 se modifican como sulfotirosina y son relevantes en la interacción de CXCR3 con sus ligandos naturales ⁸⁶. Debido a que CHARMM-GUI no contiene los parámetros para los residuos sulfatados, se decidió agregar una fosforilación en esos residuos para simular el entorno químico generado por la sulfatación. ClusPro produjo 29 modelos de interacción de los complejos en la combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (VdW-Elec) (Tabla 3). El complejo seleccionado para las simulaciones CG-MD presentó el mayor número de conformaciones en el grupo basado en la combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (modelo 0) de los 10 mejores modelos obtenidos de ClusPro (Figura 7).

Tabla 3. Scores de clúster de CXCR3B

| Clúster | Miembros | Representativos | Weighted Score |
|---------|----------|-----------------|----------------|
| 0 | 128 | Center | -192.2 |
| | | Lowest Energy | -222.1 |
| 1 | 92 | Center | -204.9 |
| | | Lowest Energy | -233.4 |
| 2 | 84 | Center | -193.8 |
| | | Lowest Energy | -250.6 |
| 3 | 69 | Center | -203.1 |
| | | Lowest Energy | -217.7 |
| 4 | 60 | Center | -212.7 |
| | | Lowest Energy | -212.7 |
| 5 | 54 | Center | -188.0 |
| | | Lowest Energy | -205.6 |
| 6 | 53 | Center | -207.9 |
| | | Lowest Energy | -207.9 |
| 7 | 52 | Center | -195.2 |
| | | Lowest Energy | -211.2 |
| 8 | 36 | Center | -190.6 |
| | | Lowest Energy | -210.3 |
| 9 | 36 | Center | -194.2 |
| | | Lowest Energy | -200.8 |
| 10 | 32 | Center | -189.9 |
| | | Lowest Energy | -206.6 |
| 11 | 30 | Center | -199.5 |
| | | Lowest Energy | -206.3 |
| 12 | 28 | Center | -188.5 |
| | | Lowest Energy | -210.3 |
| 13 | 24 | Center | -207.2 |
| | | Lowest Energy | -211.4 |
| 14 | 21 | Center | -200.3 |
| | | Lowest Energy | -220.5 |
| 15 | 20 | Center | -198.0 |
| | | Lowest Energy | -211.6 |
| 16 | 15 | Center | -194.0 |
| | | Lowest Energy | -197.9 |
| 17 | 14 | Center | -203.7 |
| | | Lowest Energy | -203.7 |
| 18 | 14 | Center | -196.8 |
| | | Lowest Energy | -207.4 |
| 19 | 13 | Center | -196.7 |
| | | Lowest Energy | -200.8 |
| 20 | 13 | Center | -188.2 |
| | | Lowest Energy | -205.2 |
| 21 | 12 | Center | -190.1 |
| | | Lowest Energy | -197.7 |
| 22 | 11 | Center | -194.4 |
| | | Lowest Energy | -197.3 |
| 23 | 11 | Center | -190.1 |
| | | Lowest Energy | -195.3 |
| 24 | 9 | Center | -188.9 |
| | | Lowest Energy | -194.9 |
| 25 | 7 | Center | -187.6 |
| | | Lowest Energy | -192.7 |
| 26 | 7 | Center | -188.8 |
| | | Lowest Energy | -214.0 |
| 27 | 6 | Center | -191.1 |
| | | Lowest Energy | -195.9 |
| 28 | 6 | Center | -187.9 |
| | | Lowest Energy | -191.0 |
| 29 | 5 | Center | -193.1 |
| | | Lowest Energy | -195.6 |

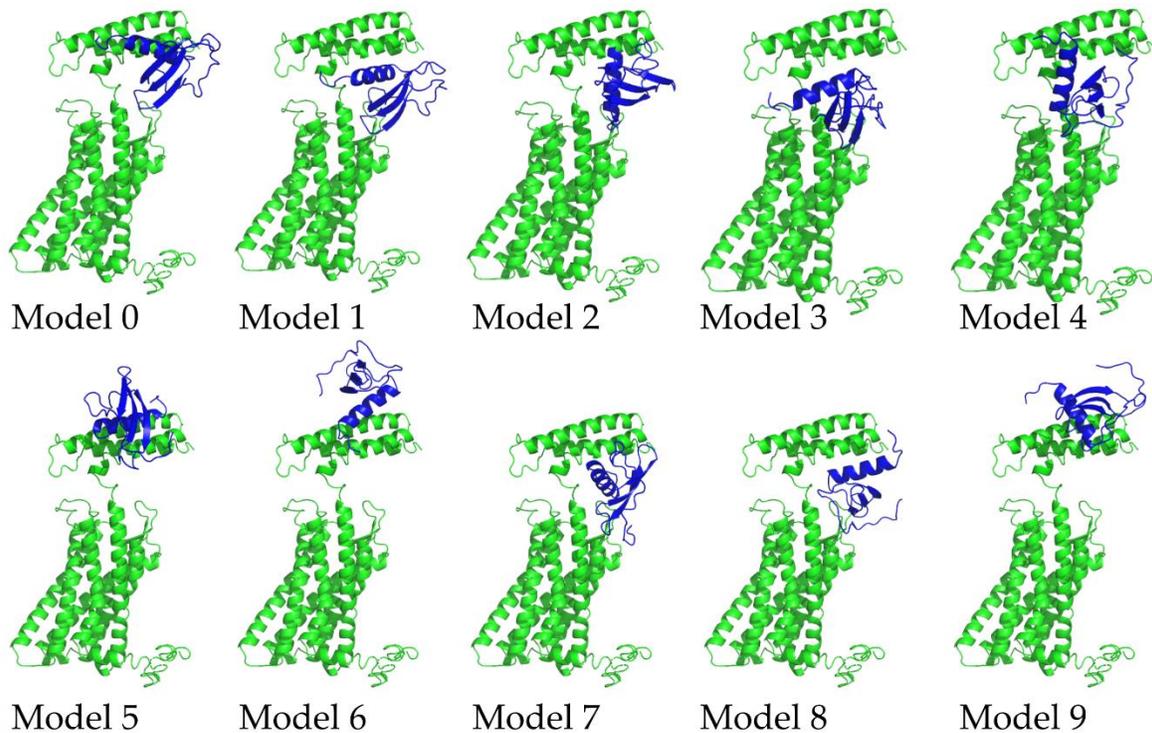


Figura 7. Modelos representativos del complejo CXCR3B

Las interacciones polares entre CXCR3B y CXCL10 del mejor complejo proteína-proteína se presentan en la Figura 8B. En las primeras interacciones de CXCR3B (cadena A) con CXCL10 (cadena Q) podemos observar 3 interacciones polares; entre Arg96-Glu80 y Lys80-Glu68 con interacciones iónicas, mientras que la única interacción de tipo puente de hidrógeno es entre Arg43-Asp75, donde esta interacción es importante pues forma parte de las interacciones de los 47 residuos únicos de CXCR3B. Además, se puede observar la presencia de un ambiente hidrofóbico entre los residuos CXCR3B y CXCL10.

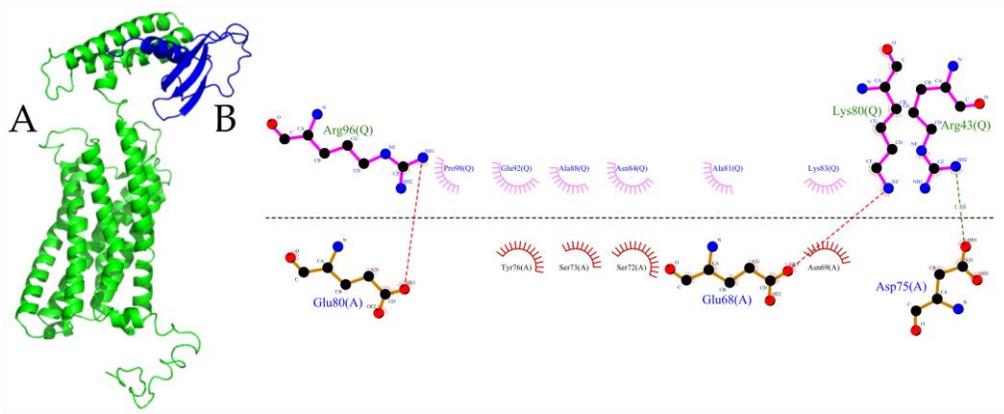


Figura 8. Primera interacción de CXCR3B con CXCL10. (A) Complejo CXCR3B-CXCL10 (B) Diagrama de interacción donde Q es CXCL10 y A es CXCR3B, las interacciones hidrofóbicas se representan en rojo y rosa, las interacciones iónicas con líneas punteadas rojas y los puentes H con líneas punteadas verdes.

8.2.2. Construcción del complejo CXCR3A-CXCL10

Usando la estructura de CXCR3A y el modelo de CXCL10, se realizó el acoplamiento proteína-proteína en el servidor público ClusPro, agregando las restricciones de interacción con los residuos 1-16 y Tyr27 y Tyr29 para observar sus interacciones preliminares ^{86,87}. ClusPro arrojó 29 modelos de interacción de los complejos en la combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (VdW-Elec) (Tabla 4).

Tabla 4. Scores de clúster de CXCR3A

| Cluster | Members | Representative | Weighted Score |
|----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 112 | Center | -354.8 |
| | | Lowest Energy | -368.0 |
| 1 | 97 | Center | -329.8 |
| | | Lowest Energy | -350.8 |
| 2 | 86 | Center | -329.6 |
| | | Lowest Energy | -372.8 |
| 3 | 81 | Center | -363.0 |
| | | Lowest Energy | -367.6 |
| 4 | 67 | Center | -360.6 |
| | | Lowest Energy | -379.6 |
| 5 | 65 | Center | -327.4 |
| | | Lowest Energy | -369.9 |
| 6 | 55 | Center | -349.7 |
| | | Lowest Energy | -349.7 |
| 7 | 52 | Center | -340.9 |
| | | Lowest Energy | -362.4 |
| 8 | 48 | Center | -340.0 |
| | | Lowest Energy | -356.5 |
| 9 | 41 | Center | -318.4 |
| | | Lowest Energy | -355.6 |
| 10 | 36 | Center | -321.3 |
| | | Lowest Energy | -347.2 |
| 11 | 29 | Center | -341.5 |
| | | Lowest Energy | -341.5 |
| 12 | 24 | Center | -323.4 |
| | | Lowest Energy | -342.8 |
| 13 | 23 | Center | -317.7 |
| | | Lowest Energy | -364.9 |
| 14 | 18 | Center | -318.4 |
| | | Lowest Energy | -334.1 |
| 15 | 17 | Center | -338.4 |
| | | Lowest Energy | -338.6 |
| 16 | 16 | Center | -338.6 |
| | | Lowest Energy | -325.3 |
| 17 | 14 | Center | -352.4 |
| | | Lowest Energy | -323.5 |
| 18 | 14 | Center | -319.2 |
| | | Lowest Energy | -333.1 |
| 19 | 13 | Center | -330.3 |
| | | Lowest Energy | -342.5 |
| 20 | 12 | Center | -342.4 |
| | | Lowest Energy | -342.4 |
| 21 | 11 | Center | -322.1 |
| | | Lowest Energy | -339.8 |
| 22 | 10 | Center | -317.0 |
| | | Lowest Energy | -340.4 |
| 23 | 9 | Center | -317.0 |
| | | Lowest Energy | -338.5 |
| 24 | 9 | Center | -323.1 |
| | | Lowest Energy | -330.9 |
| 25 | 6 | Center | -331.6 |
| | | Lowest Energy | -333.6 |
| 26 | 4 | Center | -319.2 |
| | | Lowest Energy | -319.4 |
| 27 | 4 | Center | -320.4 |
| | | Lowest Energy | -332.8 |
| 28 | 4 | Center | -318.0 |
| | | Lowest Energy | -335.8 |
| 29 | 3 | Center | -321.7 |
| | | Lowest Energy | -324.8 |

El complejo seleccionado para las simulaciones CG-MD tuvo el mayor número de conformaciones en el grupo basado en la combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (modelo 0) de los 10 mejores modelos obtenidos de ClusPro (Figura 9).

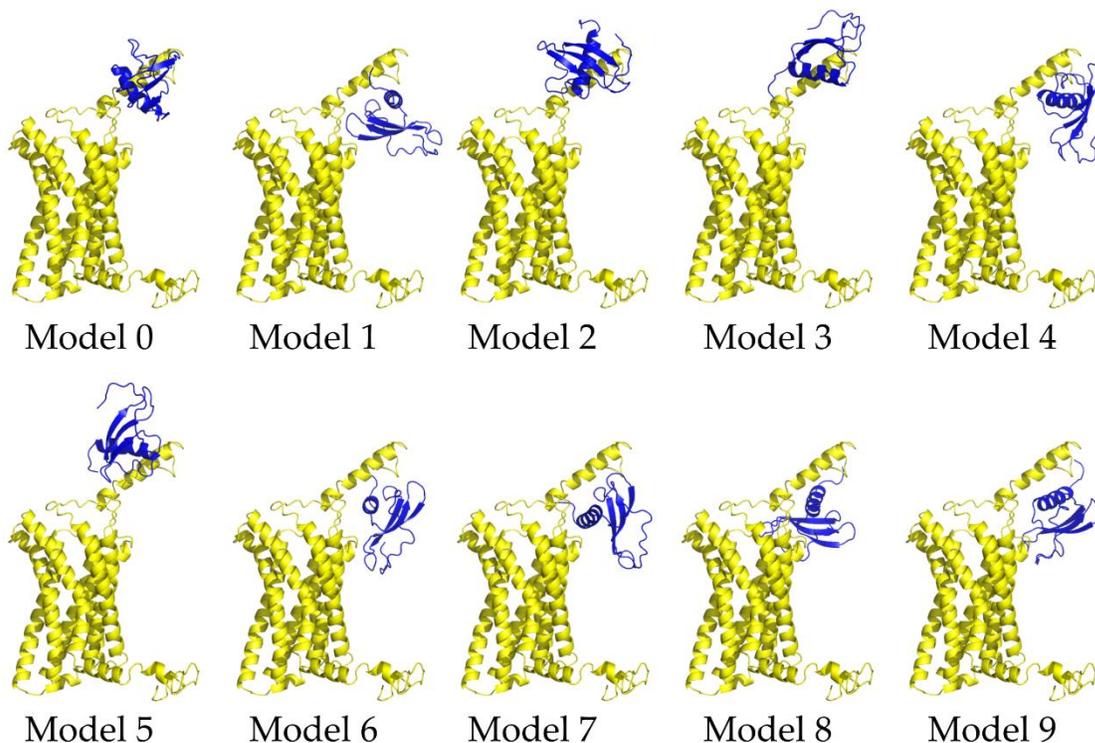


Figura 9. Modelos representativos del complejo CXCR3B

En la primera interacción de CXCR3A (R) con CXCL10 (Q), Figura 10B, se puede observar que la mayoría de las interacciones son de tipo puente de hidrógeno entre: Glu78-Ser121, Lys91-Gln9 y Leu3, Arg96-Ser6, Lys80- Asp28, Lys83-Glu31, Asn84-Tyr27 y Arg43-Ser24 y Glu21; y solo una interacción iónica entre Lys91-Asp7. Es relevante la presencia de una interacción entre Tyr27 y Asn84, debido a que Tyr27 es un residuo modificado en CXCR3 que presenta una fosforilación importante en la unión con sus respectivas quimiocinas ⁵⁷. La presencia de más interacciones en CXCR3A que en CXCR3B puede deberse a la conformación tridimensional de NH2-T, ya que sus tres hélices α limitan la interacción con CXCL10.

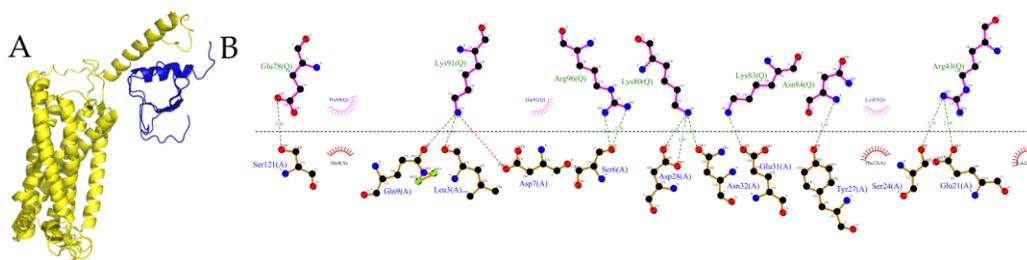


Figura 10. Primera interacción de CXCR3A con CXCL10. (A) CXCR3A en complejo con CXCL10. (B) Diagrama de interacción donde Q es CXCL10 y A es CXCR3A, las interacciones hidrofóbicas se representan en rojo y rosa, las interacciones iónicas con líneas de puntos rojas y los puentes H con líneas de puntos verdes.

8.3. Simulación CG-MD

Una vez obtenidos los modelos de los receptores CXCR3B y CXCR3A y los complejos CXCR3B-CXCL10 y CXCR3A-CXCL10, se construyeron los sistemas para simulación utilizando el servidor CHARMM-GUI en una topología *Coarse-Grained* (CG) y una simulación CG-MD de 1 μ s se realizó por quintuplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados y reducir el efecto de posibles artefactos presentes en las simulaciones. Se realizó un análisis de los segmentos transmembranales (TMs) cada 100 ns utilizando como control el *frame* 0 (F0), siendo la estructura del receptor o complejo obtenida tras los pasos de minimización y equilibrio, y el primer nanosegundo de la dinámica (F01), cada *frame* analizado se obtuvo del cálculo de la estructura representativa de cada *frame* de cada una de las 5 repeticiones. Una vez realizadas las simulaciones y obtenidas las estructuras representativas, se obtuvieron los ángulos de rotación e interacciones polares entre los TMs de cada estructura representativa. En la Tabla 5 se muestran los residuos de los TM obtenidos en Uniprot⁷² (código P49682 para CXCR3A y P49682-2 para CXCR3B), para el análisis de rotaciones, RMSD y RMSF entre los TM de CXCR3B y CXCR3A.

Tabla 5. Residuos de segmentos transmembranales en CXCR3B y CXCR3A.

| TM | TM1 | TM2 | TM3 | TM4 | TM5 | TM6 | TM7 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| CXCR3B | 101-127 | 137-157 | 173-197 | 217-236 | 260-280 | 303-324 | 341-468 |
| CXCR3A | 54-80 | 90-110 | 126-150 | 170-189 | 213-233 | 256-277 | 294-321 |

8.3.1. Simulación CG-MD de CXCR3B

Se calculó la rotación de los TMs de CXCR3B en la simulación (Figura 11). TM2 y TM6 fueron los segmentos transmembrana que tuvieron la mayor rotación durante la simulación, con TM2 mostrando la mayor rotación, con picos de rotación a 100, 400, 600, 600, 700 y

800 ns y aparentemente estabilizándose al final de la simulación. TM6 mostró un pico muy pronunciado al final de la simulación, este a 900 ns mientras que durante toda la simulación se mantuvo estable. Las otras MT no mostraron ninguna rotación notable.

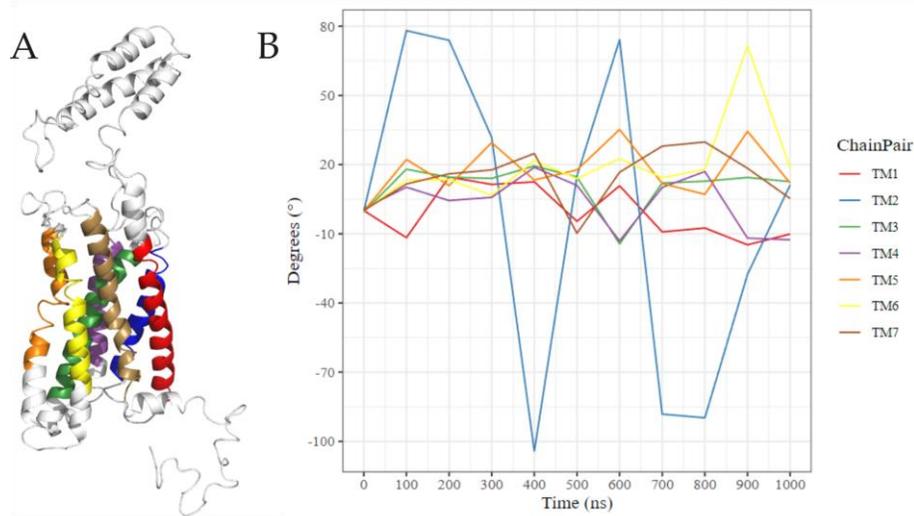


Figura 11. Rotación de segmentos transmembranales de CXCR3B.

Para CXCR3B podemos observar un movimiento creciente en las TM. Entre 100-200 ns TM1, TM2 y TM5 tienen un pico relevante, ya que a diferencia de los otros TM en este rango de tiempo aumentaron su movimiento, luego de esto se mantienen constantes hasta los 700 ns, donde TM1 muestra un aumento de pico significativo. En el caso de los loops intracelulares y extracelulares (ICL y ECL respectivamente), desde el inicio de la simulación se mantienen en constante movimiento, es hasta los 500 ns donde ICL1, ICL3, ECL1 y ECL2 tienen un pequeño pico, y luego continúan estables hasta el final de la simulación (Figura 12B). TM4 muestra movimientos significativos a 300 ns y 500 ns, y entre 700-800 ns, junto con TM1, tienen un pico significativo y luego aparentemente sigue aumentando hasta el final de la simulación (Figura 12C).

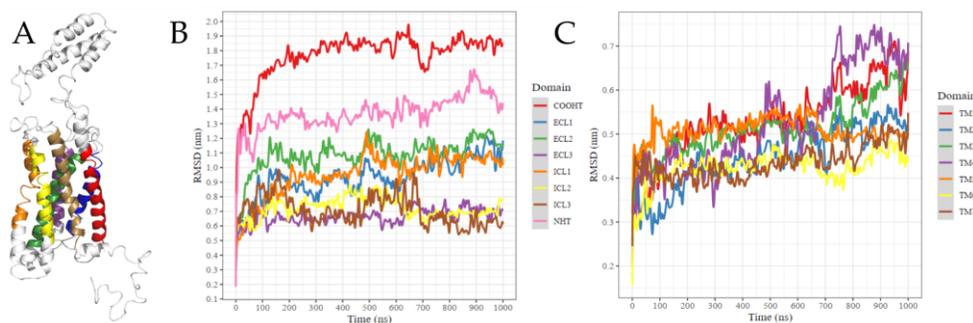


Figura 12. RMSD de CXCR3B. (A) CXCR3B con TM marcados con los colores del gráfico RMSD. (B) RMSD de los loops extracelular, intracelular, NH₂-T y COOHT. (C) RMSD de las TM donde vemos TM1 en rojo, TM2 en azul, TM3 en verde, TM4 en morado, TM5 en naranja, TM6 en amarillo y TM7 en marrón.

Las interacciones entre MTs a lo largo de la simulación son relevantes para conocer la red de interacciones polares en el estado basal y/o funcional, así como el estado metaactivo en comparación con los cambios conformacionales presentes en la simulación del complejo CXCR3B-CXCL10. En este caso, las interacciones que definimos como interacciones de "estado basal" fueron entre TM2-TM3 (Asp146-Asn181), TM3-TM4 (Asn179-Asp233 y Phe229), TM3-TM5 (Asn179-Gln266) y TM4-TM5 (Asp233-Arg263) (Tabla 6).

Tabla 6. Interacciones importantes de los TMs de CXCR3B.

| Segmentos | Residuos | Tiempo (ns) |
|-----------|---------------|------------------------|
| TM1 y TM7 | Tyr107-Ser351 | 100-800 y 1000 |
| TM2 y TM3 | Asp146-Asn181 | 400-500 y 700-900 |
| TM3 y TM4 | Asn179-Asp233 | 0-800 y 1000 |
| TM3 y TM4 | Asn179-Phe229 | 01-100, 700-800 y 1000 |
| TM3 y TM5 | Asn179-Arg263 | 0-300 y 900 |
| TM3 y TM5 | Asn179-Gln266 | 01-300, 600 y 900 |
| TM3 y TM7 | Arg196-Tyr365 | 0-01, 500 y 700-800 |
| TM4 y TM5 | Asp233-Arg263 | 0-1000 |
| TM5 y TM6 | Phe271-His319 | 100, 500, 800 y 1000 |

8.3.2. Simulación CG-MD del complejo CXCR3B-CXCL10

Se calculó la rotación de los TM en la simulación del complejo CXCR3B-CXCL10 (Figura 13). TM1, TM2, TM5 y TM7 fueron los segmentos transmembrana que presentaron mayor rotación, TM5 fue el que presentó mayor rotación a lo largo de la simulación, teniendo los picos más pronunciados a 200 y 900 ns, TM1 y TM7 a pesar de mostrar mayor estabilidad que todos los TM también tienen picos que son importantes para determinar el estado meta-

activo del receptor. TM2 muestra estabilidad hasta llegar a los 500 ns, donde presenta picos similares, pero de menor intensidad, a los de la simulación de CXCR3B sin quimiocina, estos picos están a los 600, 700 y 800 ns; si bien TM2 en la simulación de CXCR3B sin quimiocina se define como parte de las interacciones del estado basal, en presencia de quimiocina tiene un comportamiento que podemos definir como parte importante del estado meta-activo del complejo CXCR3B-CXCL10, un estado conformacional resultante de la interacción con CXCL10 que conduciría al inicio de la cascada de señalización, debido a los cambios drásticos en la rotación e interacciones polares de esta TM.

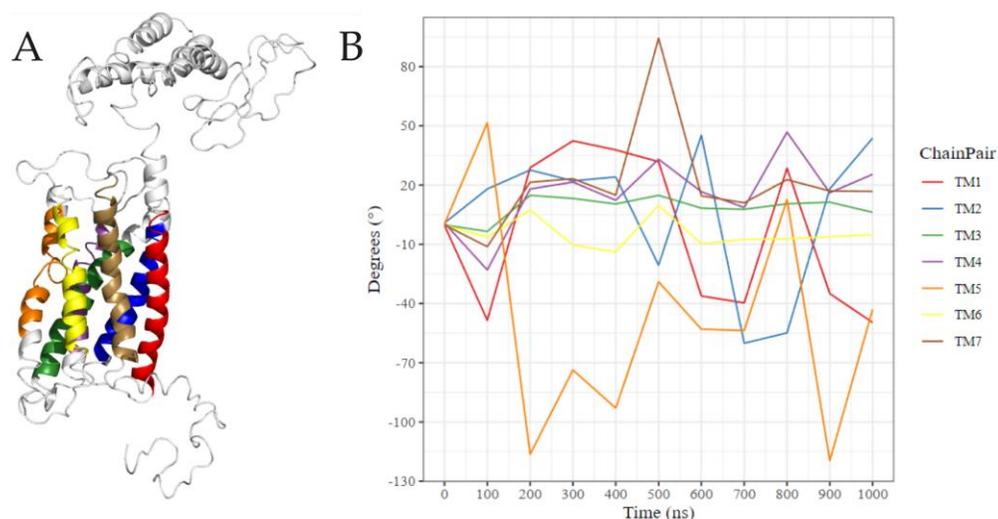


Figura 13. Rotación de los segmentos transmembrana de CXCR3B-CXCL10.

El gráfico RMSD del complejo CXCR3B-CXCL10 en sus TM muestra una estabilidad observable de la mayoría de los TM después de 200 ns. TM5 al inicio de la simulación y hasta los 200 ns es el de mayor movimiento, luego de los 200 ns se mantiene estable hasta un pico en los 600-700 ns, para después regresar a su estabilidad hasta el final de la simulación. TM4 es el segmento con mayor movimiento de toda la simulación y con picos que van aumentando entre los 300-400 ns, luego un periodo de estabilidad hasta los 600-700 ns, donde tiene un decaimiento, y luego presenta una estabilidad constante hasta 900-1000 ns donde tiene el mismo movimiento que TM5 para estabilizarse aparentemente. Para los ICL's y ECL's podemos ver que ECL1 y ECL2 son los que tienen mayor movimiento en toda la simulación, después de eso entre 100-200 ns tuvieron un pico significativo. ECL3 también tuvo un gran pico de movimiento en este rango de tiempo, pero desde ese punto hasta el final de la simulación se mantuvo estable. ICL1 también es uno de los loops que muestra un pico de movimiento significativo entre 400-600 ns, pero al igual que ECL3, vuelve a estabilizarse hasta el final de la simulación (Figura 14B). TM1, TM2 y TM3

comparten un pico de movimiento entre 600 y 700 ns y luego permanecen estables hasta el final de la simulación (Figura 14C).

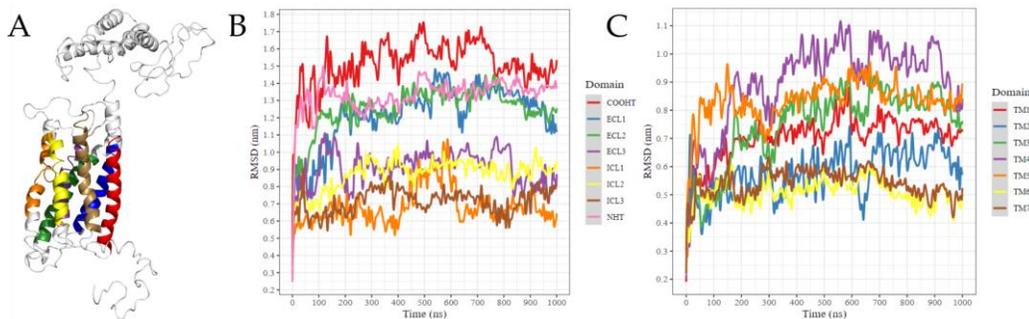


Figura 14. RMSD del complejo CXCR3B-CXCL10. (A) Complejo CXCR3B-CXCL10 con las TM marcadas con los colores del gráfico RMSD. (B) RMSD de los loops extracelulares, intracelular, NH2-T y COOHT. (C) RMSD de las TM donde vemos TM1 en rojo, TM2 en azul, TM3 en verde, TM4 en morado, TM5 en naranja, TM6 en amarillo y TM7 en marrón.

Las interacciones de TMs encontradas en la simulación del complejo CXCR3B-CXCL10 nos permitieron observar interacciones de estado basal, estas interacciones se encuentran en ambas simulaciones (CXCR3B sin quimiocina y CXCR3B-CXCL10), dos entre TM3-TM4 (Asn179-Asp233 y Asn179-Phe229) a lo largo de casi toda la simulación, apareciendo TM3-TM5 (Asn179-Gln266) a partir de los *frames* 0-01, 2, 7 y 9-10, siendo similar a la simulación de CXCR3B sin quimiocina, y finalmente TM4-TM5 (Asp233-Arg263) que se encontró en prácticamente toda la simulación (*frames* 1-10). Además de las interacciones del estado basal, encontramos interacciones del estado meta-activo, interacciones que ocurren solo en el complejo con CXCL10 e interacciones que desaparecen en el complejo con CXCL10 (Tabla 7). TM1, TM2 y TM7 son los principales TM que nos permiten observar este estado meta-activo, la interacción entre TM1 y TM2 (Asn118-Thr147) aparece en los *frames* 3, 6, 8-10, estos coinciden con el gráfico de rotación donde TM1 a los 300 ns tuvo un pico de rotación, TM2 tuvo a los 600 ns un pico de rotación importante, luego a los 700 ns y se mantuvo hasta los 800 ns donde nuevamente tuvo rotaciones significativas hasta el final de la simulación, también concuerda con algunos de los movimientos observados en el RMSD de los TMs ya que a los 300 ns tanto TM1 como TM2 tuvieron un pico de movimiento y a los 600-700 ns tuvieron otro pico importante y luego se mantuvieron estables hasta los 900 ns donde tuvieron un último pico que llegó al final de la simulación. M2 y TM7 (Asp146-Asn361) en los *frames* 0-01 y 5-8 también vieron rotaciones de TM7 en los 500 ns, siendo esta la acomodación de TM7 para interactuar con TM2, TM3 y TM7, también

encontraron movimientos en esos rangos de tiempo en el RMSD con TM2, ya que TM7 en el gráfico RMSD se mantiene estable en esos tiempos, en TM2 entre 500-700 ns tiene un pico de movimiento importante. TM6-TM7 (Val321-Lys347) que se encuentra desde la mitad y hasta el final de la simulación, que, si bien en el gráfico de RMSD no es tan claro como las interacciones de TM1 y TM2, si podemos notar como a partir de 500 ns TM6 y TM7 tienden a un movimiento mucho más estable hasta el final de la simulación. En el gráfico de rotaciones justo a 500 ns podemos observar no solo el pico de TM7, que ya se comentó, sino también una pequeña rotación en TM6, que a pesar de su El tamaño indica que solo necesitaba ese pequeño movimiento para adaptarse para interactuar con TM7.

Las interacciones de CXCR3B que desaparecen en la simulación del complejo CXCR3B-CXCL10 nos indican el estado meta-activo del receptor, estas interacciones son entre TM1-TM7 (Tyr107-Ser 351), TM3-TM5 (Asn179-Arg263), TM3-TM7 (Arg196-Tyr365) y TM5-TM6 (Phe271-His319) (Tabla 3). TM2 y TM3 (Asp146-Asn181) con ocurrencia en los *frames* 0-01, 6 y 9. Aunque esta interacción en la simulación con CXCR3B sin quimiocina se denomina interacción de estado basal, su aparición solo en estos *frames* nos da una pista de que TM2 tuvo rotaciones que impidieron más interacciones entre TM2 y TM3, convirtiéndola en una interacción de estado meta-activo, ya que, al igual que la interacción con TM1-TM2 en el *frame* 6, podemos observar este cambio tanto en el gráfico de rotaciones como en el gráfico RMSD (Tabla 8).

Tabla 7. Interacciones del estado meta-activo de CXCR3B.

| Segmentos | Residuos | Tiempo (ns) | Estado |
|-----------|---------------|----------------------|----------|
| TM1 y TM2 | Asn118-Tyr147 | 300, 600, 800-1000 | Presente |
| TM1 y TM7 | Tyr107-Ser351 | 100-800 y 1000 | Ausente |
| TM2 y TM7 | Asp146-Asn361 | 0-01 y 500-800 | Presente |
| TM3 y TM5 | Asn179-Arg263 | 0-300 y 900 | Ausente |
| TM3 y TM7 | Arg196-Tyr365 | 0-01, 500 y 700-800 | Ausente |
| TM5 y TM6 | Phe271-His319 | 100, 500, 800 y 1000 | Ausente |
| TM6 y TM7 | Val321-Lys347 | 500 y 700-900 | Presente |

Tabla 8. Interacciones importantes de los TMs del complejo CXCR3B-CXCL10.

| Segmentos | Residuos | Tiempo (ns) |
|-----------|---------------|-----------------------------|
| TM1 y TM2 | Asn118-Tyr147 | 300, 600, 800-1000 |
| TM2 y TM3 | Asp146-Asn181 | 0-01, 600 y 900 |
| TM2 y TM7 | Asp146-Asn361 | 0-01 y 500-800 |
| TM3 y TM4 | Asn179-Asp233 | 01-800 y 1000 |
| TM3 y TM4 | Asn179-Phe229 | 01-100, 300, 700-800 y 1000 |
| TM3 y TM5 | Asn179-Gln266 | 01-300, 600 y 900 |
| TM3 y TM7 | Arg196-Tyr365 | 100 |
| TM4 y TM5 | Asp233-Arg263 | 100-1000 |
| TM6 y TM7 | Val321-Lys347 | 500 y 700-900 |

El análisis de las interacciones de CXCR3B con CXCL10 con LigPlot nos permitió encontrar interacciones polares e hidrofóbicas. Las interacciones polares más importantes fueron las encontradas durante la mayor parte de la simulación, lo que sugiere que sin ellas no sería posible la unión de CXCR3B y CXCL10. Estas interacciones se presentan en la Tabla 9. La única interacción que forma parte de los 47 residuos que tiene CXCR3B es Glu34, que se encuentra a 100, 500-800 y 1000 ns.

Tabla 9. Interacciones polares de CXCR3B importantes para la unión a CXCL10 *Glu34 se encuentra en los 47 residuos únicos de CXCR3B.

| Residuos | Tiempo (ns) |
|----------|--------------------------|
| Glu34* | 100, 500-800 y 1000 |
| Asp75 | 0-01, 200-500, 700-1000 |
| Glu78 | 0-1000 |
| Tyr76 | 0-100, 500-700, 900-1000 |
| Glu80 | 0-1000 |
| Asn79 | 100-400 y 800-900 |
| Glu68 | 100-1000 |
| Asn68 | 100-600 y 800-1000 |
| Asp54 | 100-400 y 1000 |
| Asp93 | 200 y 400-1000 |

8.3.3. Simulación CG-MD de CXCR3A

La rotación de los TM se calculó en la simulación (Figura 15), donde se observan picos de rotación significativos en TM5, TM6 y TM7. TM5 mostró dos picos de rotación, uno prominente a los 100 ns y el otro entre 300-400 ns y luego se estabilizó como los otros TM. TM7 al comienzo de la simulación no mostró una rotación importante hasta los 400 ns donde tuvo un pico significativo, y luego a los 800 ns hasta el final de la simulación continuó con

picos más pronunciados. Por otro lado, TM6 solo al comienzo de la simulación mostró picos pronunciados a 100, 200, 300 y 900 ns.

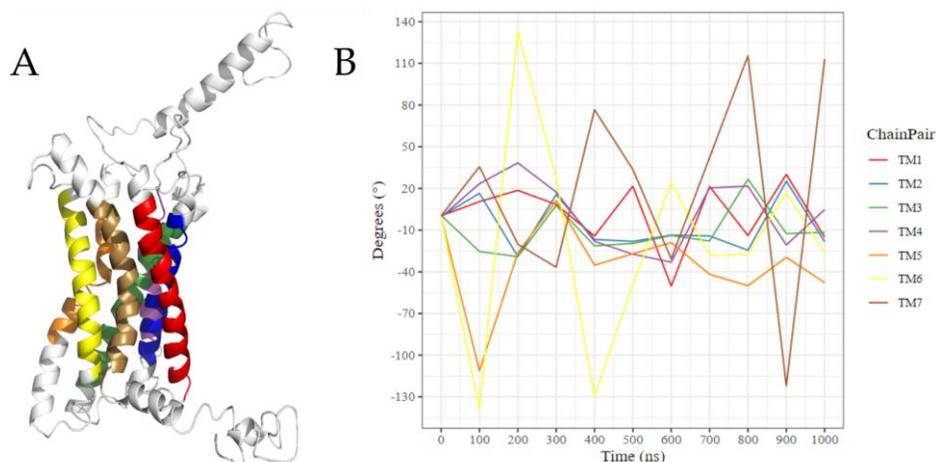


Figura 15. Rotación de segmentos transmembranales de CXCR3A.

El gráfico RMSD de los TMs de CXCR3A muestra que TM4, TM5, TM6 y TM7 tienen un gran movimiento a lo largo de la dinámica, siendo TM5 el que más movimiento tiene desde los 100 ns hasta los 700 ns donde parece estabilizarse hasta el final de la dinámica. TM6 tiene un comportamiento similar, pero de menor intensidad, al igual que TM5 a partir de 700 ns parece estabilizarse hasta el final de la dinámica. TM4 tiene solo un gran pico de movimiento de 100 a 300 ns y luego permanece estable hasta el final de la simulación. TM7 tiene un aumento constante hasta 300-400 ns donde tiene una caída en movimiento y luego continúa aumentando hasta 700 ns donde tiene un gran pico y permanece estable hasta el final de la simulación. ICL y ECL no muestran un cambio significativo en el transcurso de la simulación, mantienen un ligero aumento en el movimiento, pero parecen estabilizarse a 500 ns, solo ICL1 y ECL1 a 700 ns muestran un pequeño pico, pero se estabilizan a 800 ns (Figura 16B). TM1, TM2 y TM3 no muestran un cambio de movimiento tan repentino, permanecen en un aumento constante hasta los 600-700 ns donde encuentran el equilibrio hasta el final de la simulación (Figura 16C).

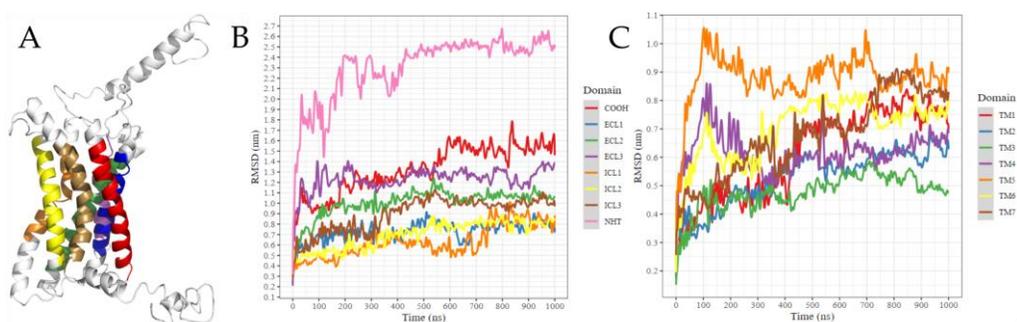


Figura 16. RMSD de CXCR3A (A) CXCR3A con TM marcados (B) RMSD de Loops extracelulares, intracelulares, NH2-T y COOHT (C) RMSD de TM donde vemos TM1 en rojo, TM2 en azul, TM3 en verde, TM4 en púrpura, TM5 en naranja, TM6 en amarillo y TM7 en marrón.

Con el análisis de las interacciones de TMs en la simulación CXCR3A, fue posible observar las interacciones de estado basal que se presentan entre TM1-TM2 (Asn71-Asp99) apareciendo en los *frames* 3, 6-7 y 10, TM3 y TM4 (Asn132-Asp186) en los *frames* 0-3, 5-6 y 8-9, y las interacciones entre TM4-TM5 (Asp186-Gln219 y Arg216) encontradas en los *frames* 0-1, 6 y 9-10 y 1-2, 4-5, 7-8 y 10 respectivamente. (Tabla 10).

Tabla 10. Interacciones importantes de los TMs de CXCR3A.

| Segmentos | Residuos | Tiempo (ns) |
|-----------|---------------|----------------------------------|
| TM1 y TM2 | Asn71-Asp99 | 300, 600-700 y 1000 |
| TM2 y TM3 | Leu104-Asn134 | 200-1000 |
| TM2 y TM3 | Thr105-Asn134 | 300-600 |
| TM3 y TM4 | Asn132-Asp186 | 0-300, 500-600 y 800-900 |
| TM3 y TM4 | Leu101-Asn134 | 400-800 |
| TM4 y TM5 | Asp186-Gln219 | 0-100, 600 y 900-1000 |
| TM4 y TM5 | Asp186-Arg216 | 100-200, 400-500, 700-800 y 1000 |

8.3.4. Simulación CG-MD del complejo CXCR3B-CXCL10

Se calculó la rotación de los TM en la simulación CXCR3A-CXCL10 (Figura 17). TM6 y TM5 mostraron los picos más pronunciados en la simulación. TM6 mostró rotaciones significativas al inicio de la simulación a los 100 y 200 ns, se mantiene estable hasta los 500 ns ya que a los 600, 700 y 800 ns presenta picos rotacionales, estos cambios rotacionales se mantienen estables hasta el final de la simulación. TM5, por otro lado, solo mostró rotaciones significativas a los 200 ns con un pico pequeño y a los 800 ns donde se ve un pico importante hasta el final de la simulación.

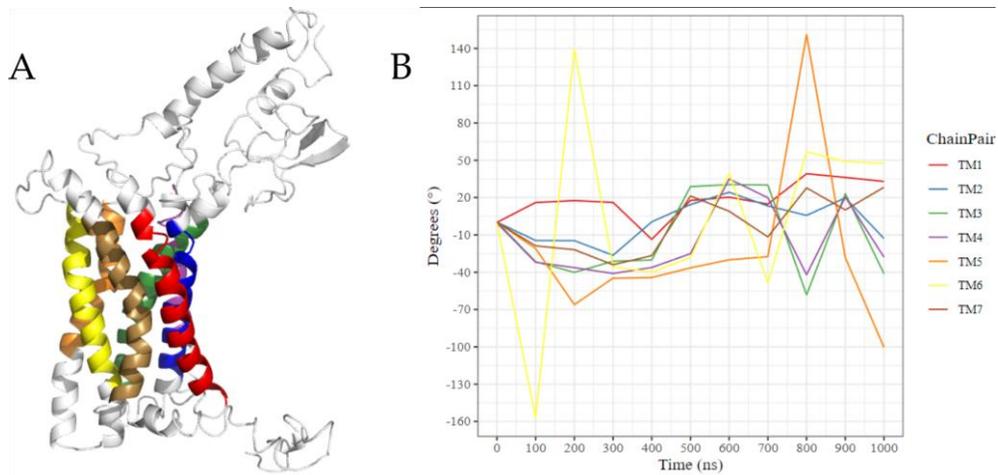


Figura 17. Rotación de los segmentos transmembranales de CXCR3A-CXCL10.

El gráfico RMSD de los dominios ICL's y ECL's del complejo CXCR3A-CXCL10, a diferencia del gráfico RMSD de la simulación CXCR3A sin quimioquinas los ICL's y ECL's permanecieron constantes, podemos observar que tienen más picos de movimiento, un ejemplo es ECL3 que es la ECL con más movimiento de toda la simulación y que entre 100-200 ns y 300-600 ns tiene 2 picos importantes de aumento para luego permanecer estable hasta el final de la simulación. ICL3 por otro lado tiene una gran cantidad de picos, entre 200-300, 300-400, 400-600 y 700-900 ns donde hay aumentos y disminuciones de movimiento. Los otros ICL y ECL no muestran aumentos en sus movimientos. ICL1 y ECL1 que eran los que presentaban pequeños picos de movimiento en la simulación CXCR3A sin quimiocina no muestran incrementos significativos o comparables a los analizados previamente (Figura 18B).

El gráfico RMSD de los TMs en la simulación del complejo CXCR3A-CXCL10 muestra un comportamiento que tiende a ser estable en la mayor parte de la simulación. TM4 desde el inicio de la simulación tiene un aumento constante de movimiento, no es hasta los 200 ns donde tiene un pico de aumento y se mantiene estable hasta los 300 ns, donde tiene una reducción para mantenerse estable hasta los 700 ns donde otro aumento de movimiento se muestra hasta los 800 ns, para luego y hasta el final de la simulación tener una reducción y su estabilización, esto en el gráfico de rotaciones lo podemos observar levemente, esto se debe a que a los 300 ns TM4 se encuentra en un estado estable rotación sin mucho aumento, entre 500-600 ns es donde muestra un aumento en la rotación de este TM y luego a los 700 ns tiene un pequeño pico de rotación para luego tener cambios de rotación a lo largo de la simulación, esto significaría que a pesar de no tener picos en el gráfico de RMSD

mantiene un movimiento de rotación que hasta cierto punto estabiliza el movimiento de RMSD. TM5 siendo el TM con mayor movimiento de toda la simulación tiene picos importantes a lo largo de la simulación, el primero a los 100 ns donde tiene su primer pico de aumento de movimiento, a los 200 ns tiene su segundo pico y a los 300 ns se reduce drásticamente y entra en una fase de estabilización hasta los 600 ns donde comienza a reducir su movimiento y a los 700 ns tiene su último pico que finaliza en los 800 ns y luego hasta el final de la dinámica tiene un aumento constante en el movimiento.

En el gráfico de rotaciones podemos observar estos movimientos, a los 100 y 200 ns tiene un pico de rotación según aumenta el movimiento, a los 300 ns tiene otro pico que mantiene rotaciones extremadamente estables hasta los 700 ns comienza un aumento de rotación y a los 800 ns alcanza la rotación máxima de toda la simulación y comienza a disminuir su rotación hasta el final de la simulación. TM6 hasta los 100 ns tuvo una estabilidad de movimiento en la gráfica RMSD donde tiene un gran pico y se mantiene estable hasta los 300 ns donde tiene aumento y disminución de movimientos entre 300-400 ns, luego a los 500, 600, 700 y 800 ns tener pequeños picos de movimiento en cada uno de los *frames*, para permanecer estable hasta el final de la simulación. Todos estos movimientos también son observables en el gráfico de rotaciones, especialmente los de 100-300 ns que son las rotaciones más pronunciadas que tiene, y es hasta los 500 ns donde comienza un aumento y disminución de los picos de rotación hasta los 800 ns donde alcanza su punto máximo de estabilidad y se mantiene hasta el final de la simulación. TM7 tiene picos de movimiento a los 100 ns, entre 700 y 800 ns y entre 900-1000 ns, en la gráfica de rotaciones se mantiene estable con pequeños picos de rotación en los 100 ns que concuerda con la gráfica RMSD, de manera que hasta los 400 ns y hasta el final de la simulación permanece en rotación constante, esto podría sugerir que solo entre 700-800 y 900-1000 ns tiene movimiento fuera del rotacional. La actividad de los TMs en el gráfico RMSD de la simulación del complejo en comparación con el gráfico RMSD de los TMs de CXCR3A sin quimiocina muestra la posible estabilización de la proteína en presencia de su ligando natural, pues aunque a escala de movimiento (nm) el complejo tiende al equilibrio, sugiere que tiende a ser más estable cuando está en contacto con CXCL10, y la gráfica de CXCR3A sin quimiocina tiene un aumento constante de movimiento posiblemente debido a que la presencia de la quimiocina estabiliza la conformación del receptor.

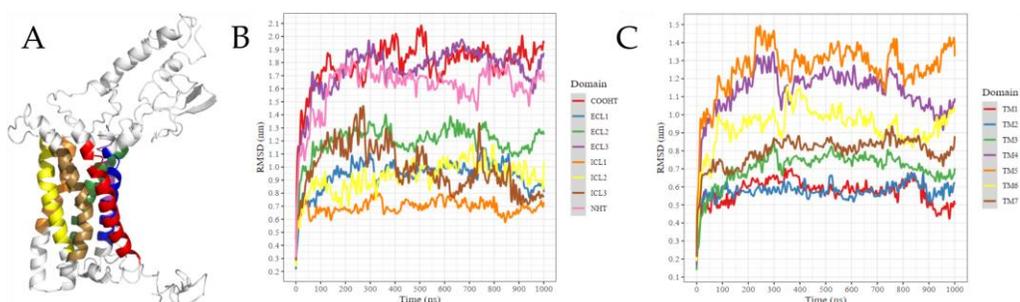


Figura 18. RMSD del complejo CXCR3A-CXCL10. (A) Complejo CXCR3A-CXCL10 con TM marcadas. (B) RMSD de los TM (C) RMSD de los loops extracelular, intracelular, NH₂-T y COOHT.

Una vez realizado el análisis de las interacciones de los TMs de la simulación del complejo CXCR3A-CXCL10, las interacciones del estado basal de la proteína, TM1-TM2 (Asn71-Aso99) se encontraron en los *frames* 0-01, 2, 6 y 8; Interacciones TM3-TM4 (Asn132-Asp186) en los fotogramas 0-4 y 6 y TM4-TM5 (Asp186-Gln219 y Arg216) en los *frames* 3-4, 6-7 y 9, y 5-6 y 8-10 respectivamente (tabla 11). Estas interacciones estuvieron presentes tanto en la simulación de CXCR3A sin quimiocina como en la simulación del complejo. También encontramos 2 interacciones presentes solo en el estado meta-activo de la proteína, entre TM2-TM3 (Val97-Asn134) en los *frames* 3, 5-7 y 9, TM2-TM7 (Asp99-Asn314) en los *frames* 0-01 y 5-7. Los *frames* donde aparecen concuerdan con los movimientos de los TMs 4, 5 y 6. La interacción entre TM2-TM7 (Asp99-Asn314) se presenta tanto en la simulación del complejo CXCR3A como en la simulación del complejo CXCR3B, (siendo por CXCR3B Asp146-Asn361) esto haciendo la diferencia de residuos entre cada isoforma del receptor (47 residuos). Esto significa que CXCR3A y CXCR3B comparten una interacción de activación entre TM2-TM7. (Tabla 12).

Tabla 11. Interacciones importantes de los TMs del complejo CXCR3A-CXCL10.

| Segmentos | Residuos | Tiempo (ns) |
|-----------|---------------|------------------------|
| TM1 y TM2 | Asn71-Asp99 | 0-01, 200, 600 y 800 |
| TM2 y TM3 | Val97-Asn134 | 300, 500-700 y 900 |
| TM2 y TM7 | Asp99-Asn314 | 0-01 y 500-700 |
| TM3 y TM4 | Asn132-Asp186 | 0-400 y 600 |
| TM4 y TM5 | Asp186-Gln219 | 300-400, 600-700 y 900 |
| TM4 y TM5 | Asp186-Arg216 | 500-600 y 800-1000 |

Tabla 12. Interacciones importantes de los TMs del complejo CXCR3A-CXCL10.

| Segmentos | Residuos | Tiempo | Estado de presencia |
|-----------|---------------|--------------------|---------------------|
| TM2 y TM3 | Leu104-Asn134 | 200-1000 | Ausente |
| TM2 y TM3 | Thr105-Asn134 | 300-600 | Ausente |
| TM2 y TM3 | Val97-Asn134 | 300, 500-700 y 900 | Presente |
| TM2 y TM7 | Asp99-Asn314 | 0-01 y 500-700 | Presente |
| TM3 y TM4 | Leu101-Asn134 | 400-800 | Ausente |

El análisis de las interacciones de CXCR3A con CXCL10 con LigPlot nos permitió encontrar interacciones polares e hidrofóbicas. Las interacciones polares más importantes fueron las encontradas durante la mayor parte de la simulación, lo que nos dice que sin ellas no sería posible la unión de CXCR3B y CXCL10. Estas interacciones se presentan en la Tabla 13. Además de estas interacciones, encontramos la presencia de interacciones polares e hidrofóbicas con Asp282 y Glu293, que son importantes en la actividad con CXCL10 ⁸⁶.

Tabla 13. Interacciones polares de CXCR3A importantes para unirse a CXCL10.

*Residuos fosforilados

| Residuos | Tiempo (ns) |
|----------|-------------------------------|
| Asp35 | 0-1000 |
| Gln9 | 0-01, 300-400, 600 y 800-1000 |
| Asp7 | 0-1000 |
| Asp13 | 0-1000 |
| Tyr27* | 0-01, 300-400, 600 y 800-1000 |
| Glu31 | 0-01, 300-600 y 800-1000 |
| Asp28 | 0-1000 |
| Glu196 | 0-200, 400-700, 900-1000 |
| Ser24 | 0, 100-200, 500 y 900-1000 |
| Glu21 | 0-1000 |
| Asn32 | 100-600 y 900 |
| Glu4 | 100-1000 |
| Glu15 | 100-1000 |
| Glu35 | 200-700 |
| Asp195 | 300-600 y 800 |
| Tyr29* | 300-900 |

8.3.5. Gráficas de distancia y RMSF de las simulaciones.

En el gráfico de distancias entre CXCL10 y sus receptores CXCR3B y CXCR3A se observa como la distancia entre el centro de masas de la quimiocina y sus receptores disminuye a medida que avanza la simulación. CXCR3B disminuyó su distancia en 1 Å al llegar a 500

ns donde, según el análisis anterior, es similar al primer paso de meta-activación, ya que se une a los movimientos de COOHT hacia ECL. (Figura 19C línea azul).

Para el caso del CXCR3A la distancia que había entre el receptor y el CXCL10 al inicio es 0.5 Å mayor, donde podemos observar una rápida disminución de la distancia a los 50 ns y otra a los 750ns, es decir que el CXCR3A cumple con la norma de 2 etapas. modelo de activación. (Figura 19C línea roja).

En el caso de CXCR3B, a pesar del mayor tamaño de NH2T, tiene un comportamiento similar a CXCR3A, disminuyendo la distancia entre la quimiocina y CXCR3B, esto podría indicar que CXCR3B se activa de manera similar a un receptor de quimiocinas, donde el primer paso es la disminución de la distancia entre la quimiocina y el receptor. Sin embargo, la naturaleza amino terminal de CXCR3B no permite una interacción destacada entre la quimioquina y las ECL (Figura 20).

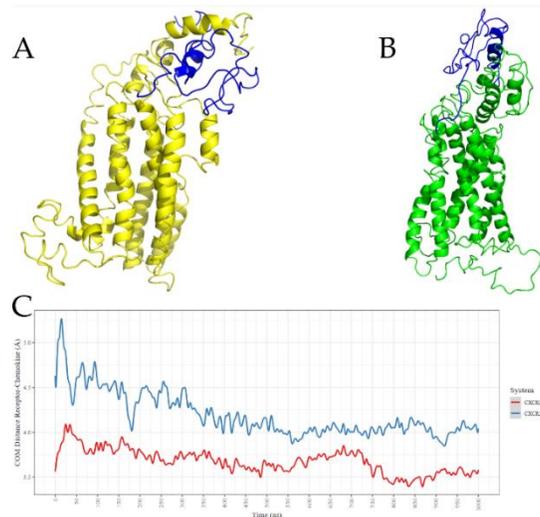


Figura 19. Distancia de CXCR3A y CXCR3B con respecto a CXCL10. (A)CXCR3A-CXCL10 a 1000 ns de simulación (B)CXCR3B-CXCL10 a 1000 ns de simulación (C) Gráfico de distancias entre CXCL10 y sus receptores.

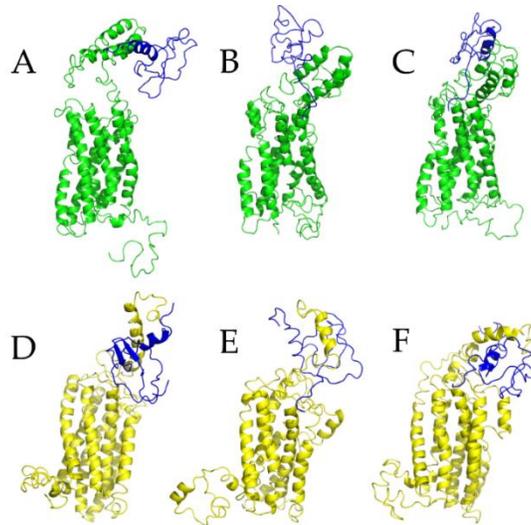


Figura 20. *frames* representativos de los complejos CXCR3A y CXCR3B (A) CXCR3B en el tiempo 0 ns (B) CXCR3B en 500 ns (C) CXCR3B en 1000 ns (D) CXCR3A en el tiempo 0 (E) CXCR3A en 500 ns (F) CXCR3A a 1000 ns.

En el gráfico RMSF podemos observar el movimiento de los residuales entre la simulación del receptor solo en comparación con el complejo, si tiende a lo positivo significa que hubo más movimiento en la simulación del complejo, por otro lado, si tiende a negativo significa que hubo más movimiento de residuales en la simulación del receptor solo.

Para CXCR3B tiene mayor movimiento en la simulación del complejo CXCR3B-CXCL10, concordando con las rotaciones y gráficos de RMSD. CXCR3A tiene mayor movimiento en la simulación de CXCR3A sin quimiocina, siendo corroborado por las gráficas anteriores (Figura 21).

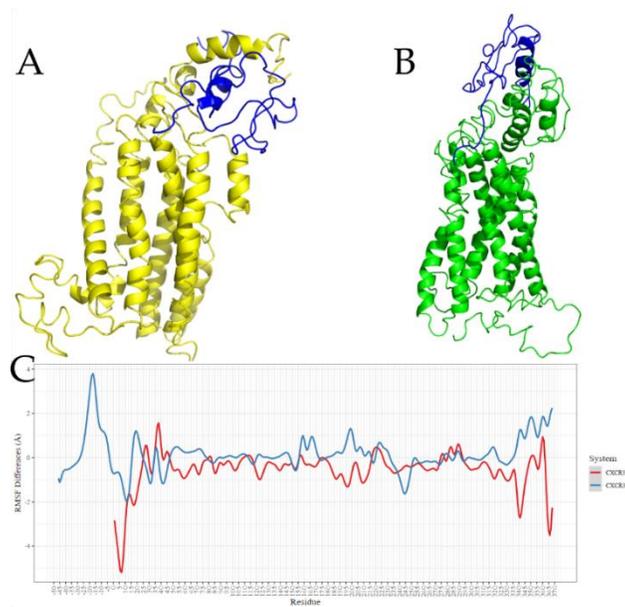


Figura 21. RMSF de CXCR3B y CXCR3A. (A) CXCR3A-CXCL10 (B) CXCR3B-CXCL10 (C) Gráfico RMSF.

Después del análisis anterior, se pueden observar las diferencias entre CXCR3B y CXCR3A, destacando las interacciones polares e hidrofóbicas de los receptores con CXCL10, ya que CXCR3A tiene más interacciones polares e hidrofóbicas en contraste con CXCR3B-CXCL10, este último tiene 3 interacciones polares que solo aparecen en su complejo, con residuos Glu34, Asn69 y Asp93. Esto sugiere que, aunque tiene una unión similar con CXCL10, CXCR3B también tiene interacciones que pueden ayudar en el desarrollo de moléculas específicas para el complejo CXCR3B-CXCL10. Además, las interacciones sugeridas como constitutivas del estado meta-activo dentro de los TM comparten un comportamiento similar entre CXCR3B y CXCR3A, como entre TM2 y TM7 (Asp146-Asn361 para CXCR3B y Asp99-Asn314 para CXCR3A), dejando en claro las diferencias que cada uno se activa la isoforma; por lo tanto, para CXCR3A TMs 2, 3 y 7 son importantes, mientras que para CXCR3B TMs 1, 2, 5 y 7 son importantes.

9. Conclusiones

Se encontraron diferencias estructurales e interacciones entre CXCR3B y CXCR3A, solos y en complejo con CXCL10. Las primeras diferencias encontradas se refieren a las estructuras tridimensionales de ambas isoformas, donde CXCR3B muestra 47 residuos únicos que forman 3 hélices alfa en el NH₂-T, mientras que CXCR3A solo tiene una hélice alfa; cambios estructurales que hacen que las interacciones entre CXCL10 y cualquiera de

las isoformas sean diferentes. En las simulaciones de CG-MD, se encontró que 3 residuos de CXCR3B (Glu34, Asn69 y Asp93 para CXCR3B, y para CXCR3A Asn22 y Asp46) mantienen una única interacción de tipo polar con CXCL10, siendo Glu34 un único residuo de CXCR3B. En la simulación de CXCR3B sin quimiocina, se observaron 2 interacciones basales únicas presentes en CXCR3B entre TM3-TM4 (Asn179-Phe229) y TM3-TM5 (Asn179-Gln266). Las simulaciones complejas reflejaron solo 1 interacción similar, entre TM2-TM7 (Asp146-Asn361 para CXCR3B y Asp99-Asn314 para CXCR3A). Los TM de mayor importancia para CXCR3B fueron TM1, TM2, TM5 y TM7, que presentaron la mayor rotación en la simulación y donde las interacciones de meta-activación (tanto presentes como ausentes) se encuentran. Además, las TM con mayor movimiento fueron TM4 y TM5. Para CXCR3A los TMs con mayor importancia son TM2, TM3 y TM7 ya que alrededor de ellos se encuentran las interacciones que están presentes y ausentes a lo largo de la simulación. Estas diferencias entre las interacciones polares, la conformación de TM de relevancia y las distancias decrecientes de CXCL10 de las isoformas nos permitieron identificar el estado meta-activo de los receptores CXCR3B y CXCR3A.

Estos datos sugieren que CXCR3B y CXCR3A son lo suficientemente diferentes en sus interacciones, así como en sus modos de meta-activación, lo que hace posible realizar un diseño de moléculas específicas de isoforma tanto para agonistas como para antagonistas, lo cual no se logró realizar en este trabajo pero queda como perspectiva.

10. Bibliografía

- (1) Dahir, A. M.; Thomsen, S. F. Comorbidities in Vitiligo: Comprehensive Review. *International Journal of Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd October 1, 2018, pp 1157–1164. <https://doi.org/10.1111/ijd.14055>.
- (2) Whitton, M.; Pinart, M.; Batchelor, J.; González, U.; Jiyad, Z.; Eleftheriadou, V. Interventions for Vitiligo (Review). *Cochrane Collab.* **2015**, No. 2, 1–305.
- (3) Stiegler, J.; Brickley, S. Vitiligo: A Comprehensive Overview. *J. Dermatol. Nurses. Assoc.* **2020**, Publish Ah. <https://doi.org/10.1097/JDN.0000000000000589>.
- (4) Murase, D.; Hachiya, A.; Takano, K.; Hicks, R.; Visscher, M. O.; Kitahara, T.; Hase, T.; Takema, Y.; Yoshimori, T. Autophagy Has a Significant Role in Determining Skin Color by Regulating Melanosome Degradation in Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, 133 (10), 2416–2424.

<https://doi.org/10.1038/jid.2013.165>.

- (5) Picardo, M.; Taïeb, A. *Vitiligo*; Picardo, M., Taïeb, A., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69361-1>.
- (6) Hernández, A. S. Células Colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y Reguladoras (Treg, TH3, NKT) En La Artritis Reumatoide. *Reumatología Clínica Suplementos*. 2009, pp 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2008.11.012>.
- (7) Annunziato, F.; Cosmi, L.; Liotta, F.; Maggi, E.; Romagnani, S. Human T Helper Type 1 Dichotomy: Origin, Phenotype and Biological Activities. *Immunology* **2015**, *144* (3), 343–351. <https://doi.org/10.1111/IMM.12399>.
- (8) Van Raemdonck, K.; Van den Steen, P. E.; Liekens, S.; Van Damme, J.; Struyf, S. CXCR3 Ligands in Disease and Therapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd June 1, 2015, pp 311–327. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.11.009>.
- (9) Caroff, E.; Meyer, E. A.; Ääänismaa, P.; Froidevaux, S.; Keller, M.; Piali, L. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Benzimidazolo-Thiazoles as Potent CXCR3 Antagonists with Therapeutic Potential in Autoimmune Diseases: Discovery of ACT-672125. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (17), 11533–11549. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00676>.
- (10) Metzemaekers, M.; Vanheule, V.; Janssens, R.; Struyf, S.; Proost, P. Overview of the Mechanisms That May Contribute to the Non-Redundant Activities of Interferon-Inducible CXC Chemokine Receptor 3 Ligands. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. January 15, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01970>.
- (11) Wang, X.; Zhang, J.; Zhou, G. The CXCL11-CXCR3A Axis Influences the Infiltration of CD274 and IDO1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **2020**. <https://doi.org/10.1111/jop.13130>.
- (12) Tulic, M. K.; Cavazza, E.; Cheli, Y.; Jacquet, A.; Luci, C.; Cardot-Leccia, N.; Hadhiri-Bziouche, H.; Abbe, P.; Gesson, M.; Sormani, L.; Regazzetti, C.; Beranger, G. E.; Lereverend, C.; Pons, C.; Khemis, A.; Ballotti, R.; Bertolotto, C.; Rocchi, S.; Passeron, T. Innate Lymphocyte-Induced CXCR3B-Mediated

- Melanocyte Apoptosis Is a Potential Initiator of T-Cell Autoreactivity in Vitiligo. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09963-8>.
- (13) Balan, M.; Pal, S. A Novel CXCR3-B Chemokine Receptor-Induced Growth-Inhibitory Signal in Cancer Cells Is Mediated through the Regulation of Bach-1 Protein and Nrf2 Protein Nuclear Translocation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (6), 3126–3137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508044>.
- (14) Li, H.; Rong, S.; Chen, C.; Fan, Y.; Chen, T.; Wang, Y.; Chen, D.; Yang, C.; Yang, J. Disparate Roles of CXCR3A and CXCR3B in Regulating Progressive Properties of Colorectal Cancer Cells. *Mol. Carcinog.* **2019**, *58* (2), 171–184. <https://doi.org/10.1002/mc.22917>.
- (15) Smith, J. S.; Alagesan, P.; Desai, N. K.; Pack, T. F.; Wu, J. H.; Inoue, A.; Freedman, N. J.; Rajagopal, S. C-X-C Motif Chemokine Receptor 3 Splice Variants Differentially Activate Beta-Arrestins to Regulate Downstream Signaling Pathways S. *Mol. Pharmacol.* **2017**, *92* (2), 136–150. <https://doi.org/10.1124/mol.117.108522>.
- (16) BLEEHEN, S. S. The Treatment of Vitiligo with Topical Corticosteroids: LIGHT AND ELECTRONMICROSCOPIC STUDIES. *Br. J. Dermatol.* **1976**, *94*, 43–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1976.tb02268.x>.
- (17) Kanwar, A. J.; Mahajan, R.; Parsad, D. Low-Dose Oral Mini-Pulse Dexamethasone Therapy in Progressive Unstable Vitiligo. *J. Cutan. Med. Surg.* **2013**, *17* (4), 259–268. <https://doi.org/10.2310/7750.2013.12053>.
- (18) Frisoli, M. L.; Essien, K.; Harris, J. E. Vitiligo: Mechanisms of Pathogenesis and Treatment. *Annu. Rev. Immunol.* **2020**, *38* (1), 621–648. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100919-023531>.
- (19) Fundacion Mexicana para la Dermatología. *Vitiligo*.
- (20) Morales-Sánchez, M. A.; Vargas-Salinas, M.; Peralta-Pedrero, M. L.; Olguín-García, M. G.; Jurado-Santa Cruz, F. Impacto Del Vitiligo En La Calidad de Vida. *Actas Dermosifiliogr.* **2017**, *108* (7), 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2017.03.007>.
- (21) Do Bú, E. A.; De Alexandre, M. E. S.; Scardua, A.; De Araújo, C. R. F. O Vitiligo Como Uma Doença Psicossocial: Apreensões de Pacientes Marcados

- Pelo Branco. *Interface Commun. Heal. Educ.* **2018**, 22 (65), 481–491. <https://doi.org/10.1590/1807-57622016.0925>.
- (22) Pandya, N. A. and A. G. *Vitiligo: Medical and Surgical Management*; 2018.
- (23) Le Poole, I. C.; Das, P. K.; van den Wijngaard, R. M. J. G. J.; Bos, J. D.; Westerhof, W. Review of the Etiopathomechanism of Vitiligo: A Convergence Theory. *Exp. Dermatol.* **1993**, 2 (4), 145–153. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1993.tb00023.x>.
- (24) Alhogbi, B. G. *Comprehensive Textbook on Vitiligo*; 2017; Vol. 53.
- (25) Kong, B. Y.; Menzies, A. M.; Saunders, A. B.; Liniker, E.; Ramanujam, S.; Guminski, A.; Kefford, R. F.; Long, G. V.; Carlino, M. S. Revised Classification/Nomenclature of Vitiligo and Related Issues: The Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2011**, 25, E1–E13. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00997.x>.
- (26) KOGA, M.; TANGO, T. Clinical Features and Course of Type A and Type B Vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **1988**, 118 (2), 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1988.tb01778.x>.
- (27) Taïeb, A. Mixed Vitiligo. In *Vitiligo*; Springer International Publishing, 2019; pp 73–80. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62960-5_7.
- (28) Lin, J. Y.; Fisher, D. E. Melanocyte Biology and Skin Pigmentation. *Nature*. Nature Publishing Group February 22, 2007, pp 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature05660>.
- (29) Mora Mendoza, P. I. Los Melanocitos: Función y Su Control Por Melanocortinas. **2017**.
- (30) Thody, A. J.; Higgins, E. M.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Burchull, S. A.; Marks, J. M. Pheomelanin as Well as Eumelanin Is Present in Human Epidermis. *Fujita Heal. Univ.* **1991**.
- (31) Spritz, R. A.; Andersen, G. H. L. Genetics of Vitiligo. *Dermatologic Clinics*. W.B. Saunders April 1, 2017, pp 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.11.013>.
- (32) Ávila, Y.; Solís, M.; Pediatría, R. G.-R. C. de; 2018, undefined. Patrón Cutáneo Pigmentario de Disposición Lineal En Un Niño, Vitíligo Segmentario

- vs. Hipomelanosis de Ito. *Revpediatria.Sld.Cu* **2018**, 90 (3), 1–8.
- (33) Caixia, T.; Daming, Z.; Xiran, L. Levels of β -Endorphin in the Plasma and Skin Tissue Fluids of Patients with Vitiligo. *J. Dermatol. Sci.* **2001**, 26 (1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(00\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(00)00156-0).
- (34) Halder, R. M.; Chappell, J. L. Vitiligo Update. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. June 2009, pp 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2009.04.008>.
- (35) Xie, H.; Zhou, F.; Liu, L.; Zhu, G.; Li, Q.; Li, C.; Gao, T. Vitiligo: How Do Oxidative Stress-Induced Autoantigens Trigger Autoimmunity? *Journal of Dermatological Science*. Elsevier Ireland Ltd January 1, 2016, pp 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.09.003>.
- (36) Zúñiga Rosales, Y.; González Herrera, Y.; Miyares Díaz, E.; Rodríguez Pelier, C. Vitiligo: Hipótesis Autoinmune. *Rev. Biomédica* **2014**, 25 (3), 123. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v25i3.43>.
- (37) David Njoo, M.; Westerhof, W. *Vitiligo Pathogenesis and Treatment*; 2001.
- (38) Passeron, T.; Ortonne, J. P. Autoimmune Etiology of Generalized Vitiligo. *Vitiligo* **2010**, 10, 35–39. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69361-1_4.
- (39) Ongenaes, K.; Van Geel, N.; Naeyaert, J. M. Evidence for an Autoimmune Pathogenesis of Vitiligo. *Pigment Cell Res.* **2003**, 16 (2), 90–100. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00023.x>.
- (40) Harning, R.; Cui, J.; Bystryń, J. C. Relation between the Incidence and Level of Pigment Cell Antibodies and Disease Activity in Vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology*. 1991, pp 1078–1080. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12492607>.
- (41) Sandoval-Cruz, M.; García-Carrasco, M.; Sánchez-Porras, R.; Mendoza-Pinto, C.; Jiménez-Hernández, M.; Munguía-Realpozo, P.; Ruiz-Argüelles, A. Immunopathogenesis of Vitiligo. *Autoimmunity Reviews*. October 2011, pp 762–765. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.02.004>.
- (42) Le Poole, I. C.; Wańkowicz-Kalińska, A.; Van Den Wijngaard, R. M. J. G. J.; Nickoloff, B. J.; Das, P. K. Autoimmune Aspects of Depigmentation in Vitiligo. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **2004**, 9 (1), 68–72.

<https://doi.org/10.1111/j.1087-0024.2004.00825.x>.

- (43) Nigam, P. K.; Patra, P. K.; Khodiar, P. K.; Gual, J. A Study of Blood CD3+, CD4+, and CD8+ T Cell Levels and CD4+:CD8+ Ratio in Vitiligo Patients. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. January 2011, p 111. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.74993>.
- (44) Wang, X. X.; Wang, Q. Q.; Wu, J. Q.; Jiang, M.; Chen, L.; Zhang, C. F.; Xiang, L. H. Increased Expression of CXCR3 and Its Ligands in Patients with Vitiligo and CXCL10 as a Potential Clinical Marker for Vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **2016**, *174* (6), 1318–1326. <https://doi.org/10.1111/bjd.14416>.
- (45) Rashighi, M.; Harris, J. E. Interfering with the IFN- γ /CXCL10 Pathway to Develop New Targeted Treatments for Vitiligo. *Ann. Transl. Med.* **2015**, *3* (21), 1–5. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.11.36>.
- (46) Rashighi, M.; Harris, J. E. Vitiligo Pathogenesis and Emerging Treatments. *Dermatologic Clinics*. W.B. Saunders April 1, 2017, pp 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.11.014>.
- (47) Molé, M.; Coringrato, M. Actualización Sobre El Vitiligo. *Dermatología Argentina* **2019**, *25* (2), 50–57.
- (48) Ferrari, S. M.; Fallahi, P.; Santaguida, G.; Virili, C.; Ruffilli, I.; Ragusa, F.; Centanni, M.; Antonelli, A. Circulating CXCL10 Is Increased in Non-Segmental Vitiligo, in Presence or Absence of Autoimmune Thyroiditis. *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V. September 1, 2017, pp 946–950. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.07.006>.
- (49) Fernández Martell, R. M.; Sánchez Fernández, C. M.; Martín Suárez, M. de los Á.; Hernández González, S. I.; Dopico Toledo, A.; Véliz Guerra, L. T. Tratamiento Del Vitiligo Con Esencias Florales de Bach. Presentación de Casos TT - Vitiligo Treatment with Bach Floral Essences. Cases Presentation. *Rev. Médica Electrónica* **2016**, *38* (1), 105–111.
- (50) Rosalía Ballona Chambergo. INHIBIDORES DE LA CALICINEURINA: UNA ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR. **2003**, 20–22.
- (51) Westerhof, W.; Nieuweboer-Krobotova, L. Treatment of Vitiligo With UV-B Radiation Topical Psoralen Plus UV-A. **2013**.

- (52) Rashighi, M.; Agarwal, P.; Richmond, J. M.; Harris, T. H.; Dresser, K.; Su, M.-W.; Zhou, Y.; Deng, A.; Hunter, C. A.; Luster, A. D.; Harris, J. E. CXCL10 Is Critical for the Progression and Maintenance of Depigmentation in a Mouse Model of Vitiligo. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6* (223). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007811>.
- (53) Rot, A.; Von Andrian, U. H. Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokinese Grammar for Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 891–928. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543>.
- (54) Li, S.; Zhu, G.; Yang, Y.; Jian, Z.; Guo, S.; Dai, W.; Shi, Q.; Ge, R.; Ma, J.; Liu, L.; Li, K.; Luan, Q.; Wang, G.; Gao, T.; Li, C. Oxidative Stress Drives CD8 + T-Cell Skin Trafficking in Patients with Vitiligo through CXCL16 Upregulation by Activating the Unfolded Protein Response in Keratinocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140* (1), 177-189.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.10.013>.
- (55) Booth, V.; Clark-Lewis, I.; Sykes, B. D. NMR Structure of CXCR3 Binding Chemokine CXCL11 (ITAC). *Protein Sci.* **2004**, *13* (8), 2022–2028. <https://doi.org/10.1110/ps.04791404>.
- (56) Booth, V.; Keizer, D. W.; Kamphuis, M. B.; Clark-Lewis, I.; Sykes, B. D. The CXCR3 Binding Chemokine IP-10/CXCL10: Structure and Receptor Interactions. *Biochemistry* **2002**, *41* (33), 10418–10425. <https://doi.org/10.1021/bi026020q>.
- (57) Aguilera-Durán, G.; Romo-Mancillas, A. Computational Study of C-X-C Chemokine Receptor (CXCR)3 Binding with Its Natural Agonists Chemokine (C-X-C Motif) Ligand (CXCL)9, 10 and 11 and with Synthetic Antagonists: Insights of Receptor Activation towards Drug Design for Vitiligo. *Molecules* **2020**, *25* (19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194413>.
- (58) Aguilera-Durán, G.; Romo-Mancillas, A. Behavior of Chemokine Receptor 6 (Cxcr6) in Complex with Cxcl16 Soluble Form Chemokine by Molecular Dynamic Simulations: General Protein-Ligand Interaction Model and 3d-Qsar Studies of Synthetic Antagonists. *Life* **2021**, *11* (4), 346. <https://doi.org/10.3390/life11040346>.

- (59) Muhammed, M. T.; Aki-Yalcin, E. Homology Modeling in Drug Discovery: Overview, Current Applications, and Future Perspectives. *Chemical Biology and Drug Design*. Blackwell Publishing Ltd January 1, 2019, pp 12–20. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13388>.
- (60) Rost, B.; Sander, C. BRIDGING THE PROTEIN SEQUENCE-STRUCTURE GAP BY STRUCTURE PREDICTIONS. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 25 (1), 113–136.
- (61) Xiang, Z. *Advances in Homology Protein Structure Modeling*; 2006; Vol. 7. <http://www.rscb.org>.
- (62) Zheng, W.; Li, Y.; Zhang, C.; Zhou, X.; Pearce, R.; Bell, E. W.; Huang, X.; Zhang, Y. Protein Structure Prediction Using Deep Learning Distance and Hydrogen-bonding Restraints in <scp>CASP14</Scp>. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2021**, 89 (12), 1734–1751. <https://doi.org/10.1002/prot.26193>.
- (63) Lozano-Aponte, J.; Scior, T. ¿Qué Sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular? *Rev. Mex. ciencias Farm.* **2014**, 45, 86–88.
- (64) Hansson, T.; Oostenbrink, C.; van Gunsteren, W. Molecular Dynamics Simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12 (2), 190–196. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00308-1).
- (65) Liu, X.; Shi, D.; Zhou, S.; Liu, H.; Liu, H.; Yao, X. Molecular Dynamics Simulations and Novel Drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. Taylor and Francis Ltd January 2, 2018, pp 23–37. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1403419>.
- (66) Lozano-Aponte, J.; Scior, T. Qué Sabe Ud. Acerca de Dinámica Molecular. *Rev Mex Cienc Farm* **2014**.
- (67) Monje-Galvan, V.; Linnea, W.; B. Klauda, J. Setting Up All-Atom Molecular Dynamics Simulations to Study the Interactions of Peripheral Membrane Proteins with Model Lipid Bilayers. **2008**, 22 (1), 325–339. <https://doi.org/10.1097/JDN.0000000000000436>.
- (68) Lyskov, S.; Gray, J. J. The RosettaDock Server for Local Protein-Protein Docking. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36 (Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn216>.

- (69) Ritchie, D. W. *Recent Progress and Future Directions in Protein-Protein Docking*; 2008.
- (70) Kozakov, D.; Hall, D. R.; Xia, B.; Porter, K. A.; Padhorny, D.; Yueh, C.; Beglov, D.; Vajda, S. The ClusPro Web Server for Protein-Protein Docking. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (2), 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>.
- (71) Li, J.; Fu, A.; Zhang, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. Springer Berlin Heidelberg June 1, 2019, pp 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>.
- (72) Apweiler, R.; Bateman, A.; Martin, M. J.; O'Donovan, C.; Magrane, M.; Alam-Faruque, Y.; Alpi, E.; Antunes, R.; Arganiska, J.; Casanova, E. B.; Bely, B.; Bingley, M.; Bonilla, C.; Britto, R.; Bursteinas, B.; Chan, W. M.; Chavali, G.; Cibrán-Uhalte, E.; Da Silva, A.; De Giorgi, M.; Fazzini, F.; Gane, P.; Castro, L. G.; Garmiri, P.; Hatton-Ellis, E.; Hieta, R.; Huntley, R.; Legge, D.; Liu, W.; Luo, J.; MacDougall, A.; Mutowo, P.; Nightingale, A.; Orchard, S.; Pichler, K.; Poggioli, D.; Pundir, S.; Pureza, L.; Qi, G.; Rosanoff, S.; Sawford, T.; Shypitsyna, A.; Turner, E.; Volynkin, V.; Wardell, T.; Watkins, X.; Corbett, M.; Donnelly, M.; Van Rensburg, P.; Goujon, M.; McWilliam, H.; Lopez, R.; Xenarios, I.; Bougueleret, L.; Bridge, A.; Poux, S.; Redaschi, N.; Aimo, L.; Auchincloss, A.; Axelsen, K.; Bansal, P.; Baratin, D.; Binz, P. A.; Blatter, M. C.; Boeckmann, B.; Bolleman, J.; Boutet, E.; Breuza, L.; Casal-Casas, C.; De Castro, E.; Cerutti, L.; Coudert, E.; Cuche, B.; Doche, M.; Dornevil, D.; Duvaud, S.; Estreicher, A.; Famiglietti, L.; Feuermann, M.; Gasteiger, E.; Gehant, S.; Gerritsen, V.; Gos, A.; Gruaz-Gumowski, N.; Hinz, U.; Hulo, C.; James, J.; Jungo, F.; Keller, G.; Lara, V.; Lemercier, P.; Lew, J.; Lieberherr, D.; Lombardot, T.; Martin, X.; Masson, P.; Morgat, A.; Neto, T.; Paesano, S.; Pedruzzi, I.; Pilbout, S.; Pozzato, M.; Pruess, M.; Rivoire, C.; Roechert, B.; Schneider, M.; Sigrist, C.; Sonesson, K.; Staehli, S.; Stutz, A.; Sundaram, S.; Tognolli, M.; Verbregue, L.; Veuthey, A. L.; Wu, C. H.; Arighi, C. N.; Arminski, L.; Chen, C.; Chen, Y.; Garavelli, J. S.; Huang, H.; Laiho, K.; McGarvey, P.; Natale, D. A.; Suzek, B. E.; Vinayaka, C. R.; Wang, Q.; Wang, Y.; Yeh, L. S.;

- Yerramalla, M. S.; Zhang, J. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1140>.
- (73) Zhang, J.; Yang, J.; Jang, R.; Zhang, Y. GPCR-I-TASSER: A Hybrid Approach to G Protein-Coupled Receptor Structure Modeling and the Application to the Human Genome. *Structure* **2015**, *23* (8), 1538–1549. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.007>.
- (74) Zhang, Y. I-TASSER Server for Protein 3D Structure Prediction. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>.
- (75) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215* (3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- (76) Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- (77) Qi, Y.; Ingólfsson, H. I.; Cheng, X.; Lee, J.; Marrink, S. J.; Im, W. CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (9), 4486–4494. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00513>.
- (78) Allouche, A. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J. Comput. Chem.* **2012**, *32*, 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- (79) Wirth, M.; Zoete, V.; Michielin, O.; Sauer, W. H. B. SwissBioisostere: A Database of Molecular Replacements for Ligand Design. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (D1), 1137–1143. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1059>.
- (80) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. *Basic Local Alignment Search Tool*; 1990; Vol. 215.

- (81) Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (W1), W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>.
- (82) Zhang, X.; Zhang, B.; Freddolino, P. L.; Zhang, Y. CR-I-TASSER: Assemble Protein Structures from Cryo-EM Density Maps Using Deep Convolutional Neural Networks. *Nat. Methods* **2022**, *19* (2), 195–204. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01389-9>.
- (83) Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (1), 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
- (84) Jha, P.; Chaturvedi, S.; Swastika; Pal, S.; Jain, N.; Mishra, A. K. Improvising 5-HT7R Homology Model for Design of High Affinity Ligands: Model Validation with Docking, Embrace Minimization, MM-GBSA, and Molecular Dynamic Simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2018**, *36* (10), 2475–2494. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1359907>.
- (85) Bisseling, T.; Cullimore, J.; Good, A. G.; Jones, J. D.; Pecher, P.; Lee, J.; Scheel, D.; Dangl, J. L.; Adio, A. M.; Denoux, C.; Jander, G.; Ausubel, F. M.; Viprey, V.; Downie, J. A.; Potvin, C.; Trudel, J.; Asselin, A.; Bellemare, G.; Taylor, T. N.; Hass, H.; Kerp, H.; Development, R. Structure of the CCR5 Chemokine Receptor–HIV Entry Inhibitor. **2013**, *341* (September), 1387–1391.
- (86) Colvin, R. A.; Campanella, G. S. V.; Manice, L. A.; Luster, A. D. CXCR3 Requires Tyrosine Sulfation for Ligand Binding and a Second Extracellular Loop Arginine Residue for Ligand-Induced Chemotaxis. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26* (15), 5838–5849. <https://doi.org/10.1128/mcb.00556-06>.
- (87) Groom, J. R.; Luster, A. D. CXCR3 Ligands: Redundant, Collaborative and Antagonistic Functions. *Immunol. Cell Biol.* **2011**, *89* (2), 207–215. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.158>.