



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE BLANCOS  
MOLECULARES RELEVANTES EN VITILIGO: ACTIVACIÓN  
DE LOS RECEPTORES CXCR3 Y CXCR6, Y MODULACIÓN  
ALOSTÉRICA DE LA TIROSINASA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. en C. GIOVANNY AGUILERA DURÁN

DIRIGIDA POR

Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

QUERÉTARO, MÉXICO  
CENTRO UNIVERSITARIO

JULIO 2021



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

Estudio computacional de blancos moleculares relevantes en Vitiligo: activación de los receptores CXCR3 y CXCR6, y modulación alostérica de la enzima Tirosinasa

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta:**

M. en C. Giovanni Aguilera Durán.

**Dirigido por:**

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas.

**SINODALES**

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas  
Presidente



Firma

Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado  
Secretario



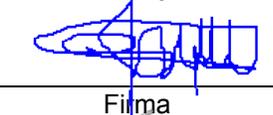
Firma

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Vocal



Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Suplente



Firma

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Suplente



Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de la beca de doctorado (335496) y por el proyecto Ciencia Básica A1-S-17090 (SEP-CONACYT-CB2017-2018).
- A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) por el apoyo del Fondo para el Fortalecimiento de Investigación (FOFI-UAQ), FCQ-201825
- A Luis Aguilar, Alejandro de León, Carlos Flores y Jair García del Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UNAM) por el apoyo técnico durante la realización de las simulaciones de dinámica molecular.
- Al Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos, por brindarme el espacio de crecimiento personal y profesional a lo largo de mi estancia en el Doctorado.
- Al Dr. Antonio Romo Mancillas, por sus enseñanzas, paciencia y comprensión en los 7 años de trabajo.
- A todos los compañeros que he conocido a lo largo de mi desarrollo académico, los cuales brindaron nuevos aprendizajes que influyeron en mi desarrollo académico-profesional.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **DEDICATORIA**

A Dios y a mi familia que siempre me apoyo a pesar de todos los obstáculos que se presentaron durante el desarrollo de mis estudios, gracias por siempre creer en mí y motivarme a seguir adelante.

Al Dr. Antonio Romo Mancillas, gracias por siempre creer en mí, por hacerme entender que había más cosas que aprender, por siempre creer en mí, por apoyarme emocional, financiera y profesionalmente, sobre todo, por siempre darme la oportunidad de ser “yo”, de equivocarme y aprender, de seguir mis sueños y guiarme cuando me desviaba del camino. Aprendí mucho de usted, es un gran investigador y un excelente ser humano, agradezco infinitamente haberlo conocido ya que mi historia, estoy seguro, sería infinitamente diferente de no haber aceptado trabajar con usted hace años. Continué con la labor de guiar a nuevos estudiantes considerando la parte emocional y profesional, gracias por todo lo que me ha brindado, no sería quien soy sin su apoyo y guía.

A todos mis amigos que estuvieron conmigo siempre, apoyando y aconsejándome, sin ustedes este viaje hubiera sido muy diferente, me acompañaron durante gran parte de todo este trayecto y mi vida hubiera sido muy triste si no los hubiera conocido. Cada uno de ustedes me ayudo de manera diferente, me hizo crecer y me dio motivos para no rendirme, a su manera, siempre estuvieron para mí, gracias infinitas por haber sido parte de mi vida. Fercchi, gracias por haber estado a mi lado desde que nos conocimos, por apoyarme en los momentos de debilidad, miedo y/o tristeza. Alex, Zyan, Balta, Brenda y Zac a todos ustedes muchas gracias.

¡Hasta la victoria siempre!

## 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.

## RESUMEN

El vitiligo es un trastorno de la piel caracterizado por la aparición de lesiones desprovistas de melanocitos. Afecta del 0.5 al 2 % de la población mundial; en México afecta del 1 al 2 % de la población. Se clasifica en tres grupos: vitiligo segmentado, no segmentado y mixto, siendo el primero el que presenta mayor prevalencia. Se han encontrado infiltrados de linfocitos CD8<sup>+</sup> sensibles a proteínas antigénicas del melanocito, los cuales promueven la apoptosis del melanocito. Por tanto, la inhibición de la migración y activación de los CD8<sup>+</sup>, así como la estimulación de la tirosinasa, pueden ser una oportunidad para el tratamiento de esta patología. Una estrategia útil para abordar lo anterior es el uso de herramientas computacionales permite el diseño de nuevas moléculas que puedan ser útiles para el tratamiento de enfermedades, en este caso el vitiligo.

En este proyecto, se construyeron los modelos por homología de los receptores de quimiocinas CXCR3, CXCR6 y de las quimiocinas CXCL9, CXCL16 así como el modelo por homología de la enzima tirosinasa. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular que permitieron observar las interacciones entre las quimiocinas (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) y el receptor CXCR3, así como las interacciones entre segmentos transmembranales (TMs).

Se comprobaron los dos pasos de activación del receptor CXCR3, así como, la separación del complejo  $\beta\gamma$  de la subunidad  $\alpha_{i/o}$  en la proteína G. Adicionalmente, la red de interacciones polares entre los segmentos transmembranales permitió observar que las interacciones entre TM3-TM4-TM6 es necesaria para la estabilización del estado funcional y meta-activo del receptor. El modelo general de interacciones proteína-ligando indicó la presencia de cuatro elementos farmacofóricos necesarios para la unión de los antagonistas de CXCR3, siendo aceptores y donadores de puentes de hidrógeno (HAc y HDn) y grupos con carga positiva (Pin) que se localizan en los loops extracelulares, y grupos hidrofóbicos (Hph) localizados entre los segmentos TM5-TM6, concordando con que la rotación de TM6 es necesaria para la activación de CXCR3 y la presencia de un elemento farmacofórico en esa zona puede inhibir esa rotación.

Para CXCR6, las simulaciones de dinámica molecular permitieron observar los dos pasos de activación del receptor, así como la relevancia de la interacción entre TM5-TM6 para estabilizar el estado inactivo del receptor. El modelo general presentó tres elementos farmacofóricos localizados cercanos a TM3 y TM6, segmentos relacionados con el estado inactivo del receptor (HDn) y a los loops extracelulares 1 y 2 (HAc y Hph), lo que podría desestabilizar la conformación funcional del

receptor y las interacciones entre CXCL16, ligando natural y CXCR6. El modelo QSAR coincidió con el modelo general, ya que los HAc proveen un campo electrostático negativo y el Hph, el campo estérico positivo, necesarios para la unión y actividad de los antagonistas reportados para CXCR6.

Finalmente, la obtención de la conformación activa de tirosinasa, presentando un sitio catalítico funcional con los átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  en complejo con una molécula de oxígeno y el modelo general de interacciones indicaron la necesidad de cinco elementos farmacofóricos, grupos hidrofóbicos, aceptores y donadores de puentes de hidrogeno, grupos aromáticos y grupos con carga negativa (Hph, HDn, Arm, HAc y NIn) para la unión a la enzima de los ligandos reportados como activadores alostéricos. Comparando la molécula con mejor docking score y el 8-metoxipsoraleno (utilizado como control), se observa que la presencia de anillos aromáticos, aceptores de puentes de hidrogeno y grupos voluminosos son los más relevantes para la unión en el sitio alostérico para activar a la tirosinasa.

Los cálculos realizados permitieron entender el comportamiento de estos blancos biológicos, tanto para entender los procesos de activación de los receptores estudiados, como para la enzima tirosinasa. La información será de utilidad para el diseño de antagonistas de los receptores CXCR3 y CXCR6 altamente selectivos, y la activación de la síntesis de melanina por la enzima tirosinasa, fenómenos que, en conjunto, podrían revertir la despigmentación observada en el vitiligo.

**Palabras clave:** Vitiligo, CXCR3, CXCR6, TYR, Acoplamiento molecular, Simulaciones de dinámica molecular

## SUMMARY

Vitiligo is a pathology characterized by the appearance of lesions devoid of melanocytes. Vitiligo affects 0.5 to 2% of the world population; its affects 1 to 2% of the population. Vitiligo is classified in three groups: segmented vitiligo, non-segmented vitiligo, and mixed vitiligo, the first one being the most prevalent and infiltrates of CD8+ lymphocytes sensitive to melanocyte antigenic proteins have been found, which promote melanocyte apoptosis. Therefore, inhibition of CD8+ migration and activation, as well as tyrosinase stimulation, may be a window for the treatment of this pathology One strategy to achieve these goals is using computational tools to design molecules that may be useful for the treatment of diseases, in this case vitiligo.

In this project, homology models of the chemokine receptors CXCR3, CXCR6 and the chemokines CXCL9 and CXCL16 were constructed, as well as the homology model of the enzyme tyrosinase. Molecular dynamics simulations were performed to observe the interactions between the chemokines (CXCL9, CXCL10 and CXCL11) and the CXCR3 receptor, as well as the interactions between transmembrane segments (TMs).

The two steps of CXCR3 receptor activation were verified, as well as the separation of the  $\beta\gamma$  complex from the  $\alpha i/0$  subunit in G-protein. Additionally, the network of polar interactions between the transmembrane segments allow to observe that the interactions between TM3-TM4-TM6, is necessary for the stabilization of the functional and meta-active state of the receptor. The general protein-ligand interaction model indicated the presence of four pharmacophoric elements necessary for the binding of CXCR3 antagonists, being acceptors and donors of hydrogen bonds (HAc and HDn) and positively charged groups (Pin) that are in the extracellular loops, and hydrophobic groups (Hph) located between the TM5-TM6 segments, consistent with TM6 rotation being necessary for CXCR3 activation, and the presence of a pharmacophoric element in that area can inhibit this rotation.

For CXCR6, molecular dynamics simulations allowed us to observe the two steps of receptor activation, as well as the relevance of the interaction between TM5-TM6 to stabilize the inactive state of the receptor. The general model presented three pharmacophoric elements located close to TM3 and TM6, segments related to the inactive state of the receptor (HDn) and to extracellular loops 1 and 2 (HAc and Hph), which could destabilize the functional conformation of the receptor and the interactions between CXCL16, natural ligand, and CXCR6. QSAR models agreed with the general model as HAc provide a negative electrostatic field and Hph the positive steric field, necessary for the binding and activity of the antagonists reported for CXCR6.

Finally, the active conformation of tyrosinase, with a functional catalytic site with  $\text{Cu}^{2+}$  atoms in complex with an oxygen molecule and the general model of interactions indicated the need for five pharmacophoric elements, hydrophobic groups, hydrogen bridge acceptors and donors, aromatic groups, and groups with negative charge (Hph, HDn, Arm, HAc and NIn) for the binding to the enzyme of the ligands reported as allosteric activators. Comparing the molecule with the best docking score and 8-methoxypsoralen (used as control), it is observed that the presence of aromatic rings, hydrogen bridge acceptors and bulky groups are the most relevant for binding at the allosteric site to activate tyrosinase.

The calculations performed allowed us to understand the behavior of these biological targets, both for understanding the activation processes of the receptors studied, as well as for the enzyme tyrosinase. The overall information derived from this study will be useful for the design of highly selective CXCR3 and CXCR6 receptor antagonists and the activation of melanin synthesis by the enzyme tyrosinase, phenomena that, together, could reverse the depigmentation observed in vitiligo.

**Keywords:** Vitiligo, CXCR3, CXCR6, TYR, Molecular docking, Molecular dynamics simulations

## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

- 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, 4413. doi: [10.3390/molecules25194413](https://doi.org/10.3390/molecules25194413)
- 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, 346. doi: [10.3390/life11040346](https://doi.org/10.3390/life11040346)

## **PROYECTOS FINANCIADOS DERIVADOS DE LA TESIS**

- 2019-2020. Responsable del proyecto del programa Química somos todos, titulado “Síntesis y evaluación bioquímica de un activador alostérico de tirosinasa para tratamiento de vitiligo”, bajo la supervisión del Dr. Antonio Romo-Mancillas, Facultad de Química, UAQ. \$30,000.
- 2018-2020. Colaborador del proyecto del programa Proyecto de Investigación con Financiamiento Interno titulado “Síntesis y evaluación de antagonistas de los receptores CXCR3 y CXCR6 como inhibidores de migración celular”, bajo la supervisión del Dr. Antonio Romo-Mancillas. Universidad Autónoma de Querétaro, Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación (FOFI-2018). \$100,000.

## **TRABAJOS LIBRES PRESENTADOS EN CONGRESOS RELACIONADOS CON LA TESIS**

- 2021. Ponencia oral titulada “Estudio computacional de la activación del receptor CXCR6 por estímulo de CXCL16s”. VII “Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos”.
- 2019. Ponencia oral titulada “Estudio computacional de CXCR3 y sus quimiocinas”. VII Congreso Nacional de Ciencias Químico Biológicas.
- 2019. Poster titulado “Estudio computacional de blancos moleculares en vitiligo”, V Simposio Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos. Con reconocimiento al primer lugar en el concurso de carteles nivel doctorado dentro de las actividades del Simposio.
- 2018. Ponencia oral “Diseño por homología de blancos de interés en vitiligo”. VI Simposio de Ciencias Químico Biológicas.

## ÍNDICE

1.	Introducción .....	1
2.	Antecedentes .....	3
2.1.	Vitiligo: clasificación, etiología y tratamiento.....	3
2.1.1.	Clasificación del Vitiligo.....	3
2.1.2.	Etiología del Vitiligo .....	5
2.1.2.1.	Participación del Estrés Oxidativo.....	6
2.1.2.2.	Teoría Autoinmune .....	7
2.1.3.	Tratamiento del vitiligo .....	8
2.2.	Blancos Moleculares de Interés en Vitiligo .....	9
2.2.1.	Receptor Para el Antígeno de Linfocitos T (TCR).....	9
2.2.2.	Inhibición de la Quimiotaxis.....	10
2.2.2.1.	C-X-C Receptor a Quimiocina 3.....	11
2.2.2.2.	C-X-C Receptor a Quimiocina 6.....	13
2.2.3.	Estimulación de la Melanogénesis.....	14
2.2.4.	Tirosinasa.....	17
2.3.	Diseño de Fármacos Asistido por Computadora.....	18
2.3.1.	Modelado de Proteínas por Homología .....	19
2.3.2.	Modelado de Interacciones Proteína-Proteína.....	19
2.3.3.	Acoplamiento Molecular (Docking).....	20
2.3.4.	Simulaciones de Dinámica Molecular .....	21
3.	Justificación .....	22
4.	Hipótesis.....	24
5.	Objetivo general .....	24
5.1.	Objetivos particulares.....	24
5.1.1.	Estudio computacional de la interacción de CXCR3 y CXCR6 con sus quimiocinas, y de TYR con activadores e inhibidores alostéricos.....	24
5.1.2.	Construcción de modelos generales de interacciones proteína-ligando.....	24
6.	Metodología .....	25

6.1.	Estructuras de las Proteínas y Modelado por Homología.....	25
6.2.	Modelo por Homología de CXCR3, CXCR6, CXCL9, CXCL16s, GP $\alpha_{i/o}$ y TYR.....	25
6.3.	Simulaciones de Dinámica Molecular All-Atom y Coarse-Grained .....	25
6.4.	Activación de los receptores CXCR3 y CXCR6, y de la activación alostérica de la enzima TYR. 27	
6.4.1.	Activación de CXCR3 .....	27
6.4.1.1.	Relajación de los Modelos por Homología.....	27
6.4.1.2.	Construcción y relajación del Complejo CXCR3-GP.....	27
6.4.1.3.	Construcción de los Complejos CXCR3/Quimiocinas .....	27
6.4.1.4.	Modelo general de interacciones proteína-ligando para CXCR3 .....	27
6.4.2.	Activación de CXCR6 .....	28
6.4.2.1.	Relajación de los Modelos por Homología.....	28
6.4.2.2.	Construcción del Complejo CXCR6-CXCL16s.....	28
6.4.2.3.	Modelo general de interacciones proteína-ligando para CXCR6 y Modelo de relación estructura-actividad 3D.....	29
6.4.3.	Estudio de la interacción de activadores alostéricos para TYR .....	29
6.4.3.1.	Construcción de la biblioteca de ligandos .....	29
6.4.3.2.	Conformación activa e inactiva de TYR.....	29
6.4.3.3.	Modelo general de interacciones proteína-ligando para TYR.....	29
6.4.3.4.	Manipulación de los Complejos y Construcción de Figuras.....	30
7.	Resultados y discusión .....	31
7.1.	Modelos por homología.....	31
7.2.	Estudio computacional de la activación del receptor a quimiocina CXCR3.....	31
7.2.1.	Activación de CXCR3 .....	31
7.2.1.1.	Relajación de los modelos por homología de CXCR3 y CXCL9 .....	32
7.2.1.2.	Construcción del complejo CXCR3-GP y relajación por AA-MD.....	33
7.2.1.3.	Construcción de los complejos CXCR3/Quimiocinas y simulaciones CG-MD.....	33
7.2.1.4.	Simulaciones 1 $\mu$ s CG-MD de los complejos CXCR3/quimiocinas.....	35
	Cambios conformacionales en CXCR3 CG-MD.....	35

7.2.1.5. Complejo CXCR3-CXCL9 .....	36
Cambios conformacionales en los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL9 .....	38
7.2.1.6. Complejo CXCR3-CXCL10 .....	39
Cambios conformacionales en los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL10 .....	40
7.2.1.7. Complejo CXCR3-CXCL11 .....	41
Cambios conformacionales en los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL11 .....	43
7.2.1.8. Separación del complejo $\beta\gamma$ de la subunidad $\alpha$ de la GP .....	44
7.2.2. Modelo general de interacciones proteína-ligando en CXCR3 .....	46
7.3. Estudio computacional de la activación del receptor a quimiocina CXCR6 .....	47
7.3.1. Activación de CXCR6 .....	47
7.3.1.1. Relajación de los modelos por homología .....	48
7.3.1.2. Construcción del complejo CXCR6-CXCL16s .....	48
7.3.1.3. Simulación 1 $\mu$ s CG-MD de CXCR6 .....	50
Cambios conformacionales en la simulación de CXCR6 CG-MD .....	50
7.3.1.4. Simulación 1 $\mu$ s CG-MD del complejo CXCR6-CXCL16s .....	52
7.3.2. Modelo general de interacciones proteína-ligando en CXCR6 .....	57
7.3.3. Modelo 3D-QSAR basado en el receptor .....	58
7.4. Estudio computacional activadores alostéricos de tirosinasa .....	60
7.4.1. Relajación del modelo por homología de TYR .....	60
7.4.2. Conformación activa e inactiva de la TYR .....	61
7.4.3. Modelo general de interacciones proteína-ligando para la enzima tirosinasa .....	62
8. Conclusiones .....	64
8.1. Conclusiones particulares .....	64
8.1.1. Activación de CXCR3 .....	64
8.1.2. Activación de CXCR6 .....	64
8.1.3. Estudio computacional de activadores alostéricos de tirosinasa .....	65

8.2.	Conclusiones generales .....	65
9.	Perspectivas .....	66
10.	Bibliografía.....	69
11.	Anexos .....	82
	Anexo I Diagramas de Ramachandran .....	82
	Anexo II. Interacciones de los complejos CXCR3-GP y CXCR3/quimiocinas.....	84
	Anexo III. Interacciones de los complejos CXCR6 y CXCR6-CXCL16s.....	100
	Anexo IV: Acoplamiento molecular de ligandos en la enzima tirosinasa.....	108

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 1. Introducción

El vitiligo es una patología de la piel caracterizada por la aparición de lesiones desprovistas de pigmentación, causado por la pérdida de melanocitos debido a la actividad de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, los cuales reconocen antígenos del melanocito para promover posteriormente la apoptosis de los melanocitos. Esta patología afecta aproximadamente del 0.5 al 2 % de la población a nivel mundial; la mayor incidencia se presenta en India, seguido de México y Japón. En 2011, en la conferencia internacional de la célula del pigmento, la Fuerza de Trabajo Europea de Vitiligo (VETF, por sus siglas en inglés) llegó a un consenso para clasificar al vitiligo en tres tipos; vitiligo no segmentado (VNS) (en el cual se puede clasificar varios subtipos), vitiligo segmentado (VS) y vitiligo mixto (VM). El VNS presenta una prevalencia mayor que el VS y puede desarrollarse a cualquier edad; sin embargo, en el 80 % de los casos se presenta antes de los 30 años y en el 15 % de los casos, antes de los 18 años. Se considera que el estrés oxidativo promueve la muerte del melanocito, debido a la producción de ROS. El estrés al que está sometido el melanocito provoca la liberación de proteínas no plegadas y exosomas, que contienen proteínas que pueden ser reconocidas como antígenos por el sistema inmune. Se ha reportado la participación tanto de la respuesta humoral mediada por anticuerpos, como, de la respuesta celular mediada por linfocitos. Se han realizado diversos estudios para dilucidar las moléculas que participan como antígenos de la respuesta inmune en vitiligo; no obstante, no son conocidos todos los autoantígenos, ni los epítopes que participan en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Se ha reportado la correlación de la actividad de los linfocitos CD8<sup>+</sup> con el progreso e intensidad del vitiligo, ya que inducen apoptosis en los melanocitos, queratinocitos y daño en la estructura de la epidermis. En un modelo de co-cultivo de piel sana de pacientes con vitiligo y células T perilesionales, las cuales fueron estimuladas mediante la presentación de antígenos. Se corroboró la apoptosis mediada por activación de CD8<sup>+</sup> melanocitotóxicos. Para cuantificar la activación, se observó la expresión de CD69 para activación temprana y CD137 para activación específica de CD8<sup>+</sup>. Para la función citolítica, se cuantificó la expresión del marcador citotóxico granzima-B y la translocación en membrana de CD107a, que indica degranulación citotóxica.

Los ejes de señalización CXCR3-CXCR10 y CXCR6-CXCL16 son importantes en la patogénesis y progresión de la enfermedad. Se han reportado en modelos animales que las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 participan en la quimiotaxis de los linfocitos CD8<sup>+</sup>; además, existe una sobreexpresión de CXCR3 en linfocitos perilesionales de pacientes con vitiligo comparados con pacientes sanos. Se reportó que CXCL10 participa en la migración y capacidad efectora de los linfocitos CD8<sup>+</sup>, en un modelo animal donde inhibieron la expresión de CXCL9 y CXCL10. De manera similar, CXCL16 es liberada por queratinocitos del microambiente lesional estimulados por la respuesta a proteínas mal plegadas del melanocito (derivada de un desbalance en las especies reactivas de oxígeno), promoviendo la migración de linfocitos CD8<sup>+</sup>. En ese sentido, hay estudios donde se ha reportado un incremento en la concentración de CXCL16 en piel lesional de pacientes con vitiligo comparados

con pacientes sanos. Por otra parte, un blanco también importante es la tirosinasa, enzima responsable de iniciar la cadena de reacciones para la síntesis de melanina; en años recientes se ha reportado la síntesis de moléculas capaces de activar esta enzima, entre éstas, derivados de chalconas que estimulan la actividad de la tirosinasa. Por otra parte, la tirosinasa es una glicoproteína enzimática, oxidasa dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$ , localizada en la membrana del melanosoma cuyo sustrato es la tirosina y cataliza la conversión de L-tirosina en L-DOPA iniciando la cascada de reacciones involucradas en la melanogénesis, un proceso complejo que involucra diferentes proteínas y se lleva a cabo en organelos específicos llamados melanosomas debido a la alta producción de ROS, como quinonas y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , moléculas tóxicas para el melanocito.

El tratamiento actual para el vitiligo está dirigido a reestablecer la integridad funcional del melanocito, promoviendo la repigmentación de las áreas afectadas. Desafortunadamente, estos tratamientos no son totalmente efectivos y presentan limitaciones, como el tiempo de tratamiento en el caso de la fototerapia y fotoquimioterapia, riesgo de efectos secundarios, para los corticosteroides y altos costos como el tacrolimús y pimecrolimús.

Debido a la naturaleza multifactorial del vitiligo, la terapéutica actual es insuficiente para tener un remedio eficaz debido a que se aborda sólo un factor determinante en este padecimiento, provocando que la terapéutica sea polifarmacológica por tiempo prolongado, incrementando los costos y disminuyendo la disposición del paciente a seguir el tratamiento. En ese sentido, el diseño y síntesis de moléculas antagonistas de los receptores CXCR3, CXCR6 y de moléculas que activen de manera alostérica la tirosinasa, utilizando técnicas computacionales como modelado por homología, acoplamiento y dinámica molecular, pueden contribuir en el tratamiento eficaz del vitiligo inhibiendo la migración de  $\text{CD8}^+$  hacia la epidermis, disminuyendo la muerte del melanocito, y estimulando la melanogénesis para promover una repigmentación, de tal manera que se pueda mejorar la calidad de vida de los pacientes con vitiligo.

## 2. Antecedentes

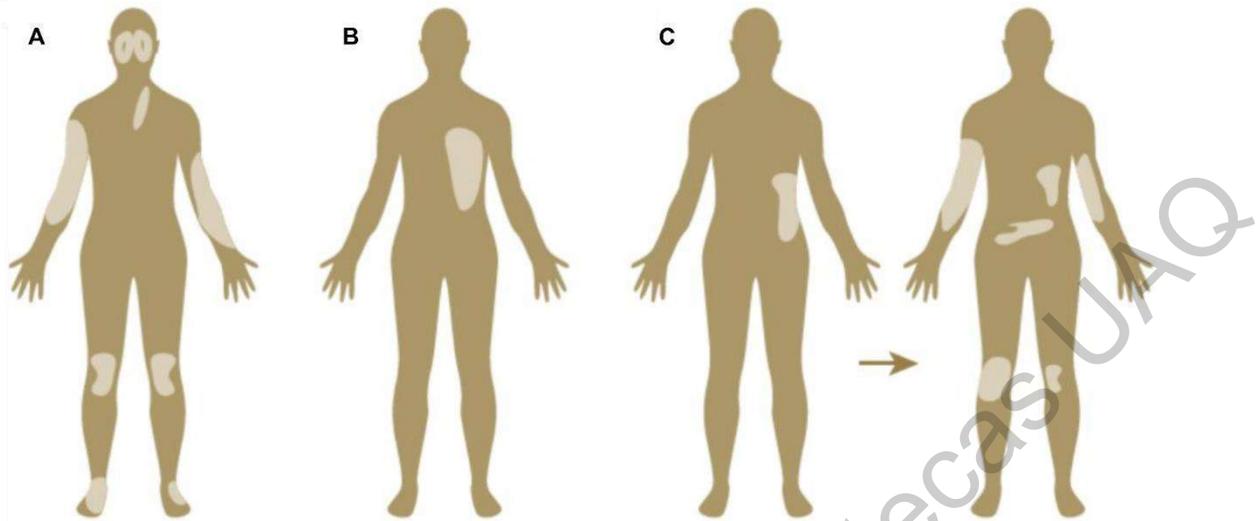
### 2.1. Vitiligo: clasificación, etiología y tratamiento

El vitiligo es una patología de la piel caracterizada por la presencia de máculas blancas desprovistas de melanocitos funcionales, o en su defecto, carentes de melanocitos [1]. Esta patología afecta aproximadamente del 0.5 al 2 % de la población a nivel mundial; la mayor incidencia se presenta en India, seguido de México y Japón [2–4]. Según la Fundación Mexicana de Dermatología, el vitiligo es la quinta causa de visitas al dermatólogo y afecta del 1 al 2 % de la población mexicana, realizándose su diagnóstico con ayuda de la lámpara de Woods [5]. En 1959, se reportó que la etiología del vitiligo estaba relacionada con los melanocitos y que en las regiones despigmentadas, no se encontraban melanocitos o su funcionalidad estaba disminuida [6].

El vitiligo es resultado de la interacción entre factores ambientales, genéticos e inmunológicos, lo que contribuye a la destrucción del melanocito [5,7]. Las lesiones aparecen con mayor frecuencia en cara, manos, muñecas, axilas, ombligo y zonas periorificiales [8]. En el año 1926 fue reportada la participación del sistema inmune en la etiología del vitiligo cuando se encontraron autoanticuerpos dirigidos contra componentes del melanocito e infiltrados perilesionales de linfocitos CD8<sup>+</sup> en pacientes con vitiligo [6]. En el año 2001, se confirmó el rol genético relacionando la influencia del gen SLEV1 (NALP1) en el cromosoma 17p13 con el desarrollo de la enfermedad, debido a que este gen codifica un regulador de la respuesta inmune innata. Adicionalmente en el año 2010, se realizó una asociación genómica a gran escala en dos diferentes poblaciones de China, lo que permitió la identificación de al menos 16 *loci* que contribuyen a la susceptibilidad del vitiligo [9]. El vitiligo no es una patología que ponga en riesgo la vida del paciente; sin embargo, tiene grandes implicaciones en la calidad de vida del mismo [4].

#### 2.1.1. Clasificación del Vitiligo

En 2011, en la conferencia internacional de la célula del pigmento, la Fuerza de Trabajo Europea de Vitiligo (VETF, por sus siglas en inglés) llegó a un consenso para clasificar al vitiligo en tres tipos; vitiligo no segmentado (VNS) (en el cual se puede clasificar varios subtipos), vitiligo segmentado (VS) y vitiligo mixto (VM) (Figura 1) [1]. El VNS se caracteriza por máculas de diferente tamaño y forma, se distribuye generalmente de manera simétrica, y presenta alta asociación con el sistema inmune [1,7,8]. Es posible observar eritema transitorio al exponer las lesiones a la luz ultravioleta (UV); además, se observan bordes hiperpigmentados rodeando las lesiones. Las lesiones se pueden presentar en cuero cabelludo e incluso es probable la aparición de cabello despigmentado. El VNS presenta una prevalencia mayor que el VS y puede desarrollarse a cualquier edad; sin embargo, en el 80 % de los casos se presenta antes de los 30 años y en el 15 % de los casos, antes de los 18 [10].



**Figura 1.** Clasificación del vitiligo. A) Vitiligo no segmentado (VNS), B) Vitiligo segmentado (VS) y C) Vitiligo mixto (VM) [7].

El curso del VNS es variable, ya que pueden aparecer lesiones a lo largo de la vida. Éste presenta de manera frecuente el fenómeno de Koebner, también llamado efecto Koebner, que es el desarrollo de lesiones hipopigmentadas en un sitio específico, donde se ha presentado algún tipo de trauma [7]; la incidencia de este fenómeno en pacientes con vitiligo es del 21 al 62 %. No se ha demostrado correlación entre la etnia y la aparición de este fenómeno; sin embargo, algunos autores indican que el FK no se presenta en VS o puede presentarse de manera poco frecuente: en este último caso, se ha demostrado que el VS evolucionó a VM [11].

El VS posee diferencias importantes con respecto a su etiología y prevalencia, en comparación con el VNS. El VS es menos común que el VNS, no presenta asociación autoinmune, usualmente es unilateral con distribución dermatomal, es de desarrollo temprano y rápida propagación. Sin tratamiento, las lesiones persisten toda la vida, aunque el desarrollo de la enfermedad, comúnmente, se detiene dentro de los primeros dos años después del comienzo. El vitiligo en niños consiste en el 78 % de los casos en VNS, en el 14.4 % en vitiligo focal y en el 4.6 % en VS [8].

La coexistencia de VS y VNS se reportó por primera vez en un paciente pediátrico diagnosticado con VNS, el cual al ser tratado con radiación ultravioleta de tipo B (UVB), desarrolló una lesión recalcitrante, que sugirió la preexistencia de VS; a esta condición de le denominó vitiligo mixto. La presencia de *Halo nevi* y leucotriquia pueden ser factores para el desarrollo de VM. Se ha propuesto que el VS puede progresar hasta VM [1]. En la tabla 1, se resumen las características del VNS y el VS, los cuales son los dos grupos más importantes.

**Tabla 1.** Comparación entre VNS y VS

	VNS	VS
Prevalencia	72-95%	5-28%
Distribución	Simétrica, no dermatomal	Unilateral, dermatomal
Inicio	A cualquier edad	Edades tempranas
Curso	Variable en el crecimiento de las lesiones, aparecen lesiones a lo largo de la vida	Desarrollo rápido al inicio de la enfermedad, progresión lenta después de los 2 años
Etiología	Autoinmune	Neuroquímica
KP	Frecuente	Poco frecuente

Algunos autores consideran que el VNS y el VS se producen por diferentes etiología, relacionando la asociación con el sistema inmune [1].

### 2.1.2. Etiología del Vitiligo

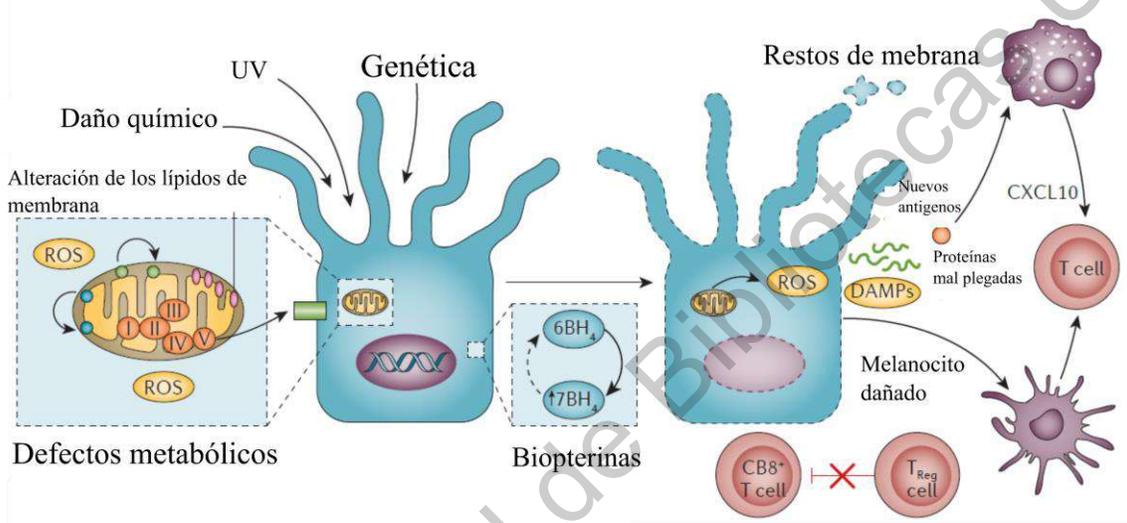
Aunque en la actualidad la etiología del vitiligo aún no está esclarecida en su totalidad, se han propuesto diferentes teorías para explicar la pérdida de los melanocitos y su funcionalidad: la teoría neural, la melanocitorragia, la teoría autocitotóxica, mediada por la participación del estrés oxidativo, y la teoría autoinmune, teniendo en cuenta siempre los factores genéticos que predisponen al desarrollo del vitiligo [3]. En 2003, se propuso la teoría de la melanocitorragia la cual propone que el vitiligo es provocado por lesiones o estrés, causado por traumas físicos, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y catecolaminas. Esto causa el desprendimiento de las uniones intracelulares con los queratinocitos y posteriormente la muerte celular [12]. Por otro lado, la teoría neural propone la acumulación de neurotransmisores como noradrenalina, adrenalina, metadrenalina (MN), normetadrenalina (NMN), ácido homovanílico, (HVA) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) [3]. Además, la exposición a químicos como alquifenoles, catecoles y cinamaldehído, se relaciona con el desarrollo de vitiligo [1,8].

El VNS se relaciona con una etiología autoinmune y el VS se relaciona con la acción de mediadores químicos liberados en los nervios periféricos y daño axonal que provoca un desbalance en la liberación de neuropéptidos, lo que da como resultado una disminución en la síntesis de melanina. Adicionalmente, se ha reportado un aumento en la expresión de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  y se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  producido por linfocitos T perilesionales promueve el desarrollo de linfocitos T citotóxicos; sin embargo, el uso de bloqueadores de TNF- $\alpha$  como el adalimumab y el infliximab se ha asociado con el desarrollo de vitiligo en pacientes con otras enfermedades autoinmunes [13].

De las teorías propuestas, la teoría autoinmune y la participación de estrés oxidativo son las más aceptadas [4]. Se considera que existe una correlación entre el sistema inmune y el estrés oxidativo, ya que este último promueve la acumulación de catecolaminas y especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) que son agentes tóxicos para el melanocito. Aunque el melanocito posee enzimas antioxidantes, estas se ven disminuidas por las elevadas concentraciones de ROS. Además, la acumulación de ROS explicaría la relación inflamatoria en el vitiligo [3,7,14].

### 2.1.2.1. Participación del Estrés Oxidativo

Una actividad incrementada en la síntesis de melanina resulta tóxica para el melanocito y lo lleva a su destrucción por medio de apoptosis debido a la excesiva producción de metabolitos tóxicos y su inadecuada eliminación. Los melanocitos poseen un mecanismo de regulación intrínseco que permite la eliminación de metabolitos tóxicos y la alteración de este mecanismo promueve la muerte celular [15]. Se considera que el estrés oxidativo promueve la muerte del melanocito, mediado por la producción de ROS, las cuales provocan la apoptosis celular, además de la formación de antígenos que promueven la estimulación del sistema inmune [3,15,16].



**Figura 2.** Impacto del estrés oxidativo en el melanocito. La presencia de ROS derivada de alteraciones en el metabolismo del melanocito promueve la liberación de proteínas mal plegadas y antígenos que son reconocidos por las células dendríticas y posteriormente pueden activar a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que promoverán la destrucción de otros melanocitos [7].

Las ROS promueven daños en el ADN y peroxidación de lípidos y proteínas, mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede actuar como inhibidor de la enzima tirosinasa (TYR) solo o formando un complejo con la L-DOPA. El aumento de la concentración intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve la expresión de TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1, los cuales son potentes inhibidores de la melanogénesis. De las enzimas antioxidantes presentes en el melanocito, la enzima glutatión peroxidasa (GPx) y la enzima catalasa (CAT), se encuentran disminuidas en su actividad; sin embargo, la súperoxido dismutasa (SOD) mantiene una actividad elevada en pacientes con vitiligo [3,5]. De igual manera, el estrés al que está sometido el melanocito provoca la liberación de proteínas mal plegadas y exosomas, que contienen proteínas que pueden ser reconocidas como antígenos por el sistema inmune [15]. Por tal motivo, el estrés oxidativo promueve la generación de células autorreactivas que reconocerán a los melanocitos como agentes extraños a eliminar (Figura 2).

### 2.1.2.2. Teoría Autoinmune

Se han reportado la participación tanto de la respuesta humoral mediada por anticuerpos, así como, de la respuesta celular mediada por linfocitos. Se han realizado diversos estudios para dilucidar las moléculas que participan como antígenos de la respuesta inmune en vitiligo; no obstante, no son conocidos todos los autoantígenos, ni los epítopes que participan en el desarrollo y progresión de la enfermedad. El uso de técnicas como las librerías en fagos han permitido obtener información para la identificación de algunos de los autoantígenos y epítopes relacionados con el reconocimiento por parte de los autoanticuerpos presentes en vitiligo [17]. Se han identificado autoantígenos específicos en vitiligo como la enzima tirosinasa (TYR), las proteínas relacionadas con la tirosinasa 1 y 2 (TRP-1 y TRP-2), la proteína gp100 (Pmel17), el factor de transcripción SOX10 y el receptor de la hormona concentradora de melanina 1, así como, autoanticuerpos anti-ADN y anti-histona [1,18]. Adicionalmente, se han reportado antígenos de superficie para anticuerpos de tipo IgG anti-melanocitos en suero de pacientes con vitiligo; los anticuerpos anti-melanocitos estimulan la expresión de la ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular 1), la cual está relacionada con reacciones inmunológicas e inflamatorias, y de la IL-8 (interleucina 8), citocina proinflamatoria [19]. También han sido reportados autoanticuerpos contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH), tanto en pacientes con VNS así como pacientes con alopecia areata [20]. Se ha logrado identificar en suero de pacientes con VNS nuevas moléculas que pueden ser reconocidas por los autoanticuerpos, como la HSP 90 (proteína de shock térmico 90), la proteína Rab38, la proteína osteopontina, el factor de traducción 2 y la enzima UCE (enzima conjugadora de ubiquitina) [18]. Por otra parte, se han identificado los epítopes de la TYR reconocidos por los autoanticuerpos presentes en suero de pacientes con vitiligo, mediante el uso de derivados de TYR con deleciones en diferentes secuencias de aminoácidos (a.a.) e inmunoprecipitación. Se encontraron 5 secuencias reconocidas, 3 en la región central de la enzima, cerca del amino terminal que van del aminoácido 240 al 254 (DEAKCDICTDYMGG), del aminoácido 289 al 294 (CNGTPE) y del aminoácido 295 al 300 (GPLRRN), y dos en la región cercana al carboxilo terminal que van del aminoácido 435 al 447 (NGDFFISSKDLGYD) y del aminoácido 461 al 479 (QDYIKSYLEQASRIWSWLL). Además, encontraron coincidencias entre los epítopes de la TYR y la secuencia de a.a. de las proteínas TPR-1 y TRP-2 [21].

Por otro lado, se ha reportado la relación del gen del antígeno linfocitario citotóxico 4 (CTLA4), encargado de la codificación de CTLA4, proteína de regulación de linfocitos T activos, con la susceptibilidad a vitiligo en pacientes con otras enfermedades autoinmunes [22]. La pérdida de melanocitos debido a un desbalance entre las células T reguladoras y las citotóxicas, promovido por disminución en la expresión de CTLA4, influye en la capacidad de supresión de los linfocitos CD4<sup>+</sup>; adicionalmente, los altos niveles de citocinas como IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$ , inducidos por la IL-17a y el IFN- $\gamma$ , promueven la apoptosis del melanocito porque son inhibidores paracrinos de éstos. Por otro

lado, los linfocitos CD8<sup>+</sup> melanocitotóxicos liberan granzima B, perforinas e IFN- $\gamma$  para la promover destrucción del melanocito [14].

Se ha reportado la correlación de la actividad de los linfocitos CD8<sup>+</sup> con el progreso e intensidad del vitiligo, ya que inducen apoptosis en los melanocitos, queratinocitos y daño en la estructura de la epidermis. En un modelo de co-cultivo de piel sana, de pacientes con vitiligo, y células T perilesionales, las cuales fueron estimuladas mediante la presentación de antígenos de HLA-A2/Tyr<sub>369-377</sub>, gp100<sub>280-288</sub>, gp100<sub>209-217</sub> y MART-1<sub>26-35</sub>, se corroboró la apoptosis mediada por activación de CD8<sup>+</sup> melanocitotóxicos. Para cuantificar la activación se observó la expresión de CD69, para activación temprana y CD137 para activación específica de CD8<sup>+</sup>. Para la función citolítica se cuantificó la expresión del marcador citotóxico granzima-B y la translocación en membrana de CD107a, que indica degranulación citotóxica. Además, se cuantificó la liberación de citocinas IL-4, promotor de la respuesta humoral y de citocinas proinflamatorias como IL17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . La activación de CD8<sup>+</sup> por la expresión de CD69 y CD137, así como de granzima-B y CD107a y la cuantificación de caspasa 3 activa, se utilizaron como marcadores de apoptosis. Esta apoptosis fue inducida por el reconocimiento antigénico de los linfocitos CD8<sup>+</sup> a antígenos de melanocito, pero no es excluyente la participación de los autoanticuerpos contra proteínas del melanocito, frecuentemente presentes en varios pacientes con vitiligo. Estos anticuerpos pueden ayudar a poner en marcha el reconocimiento de las células T, mediante la presentación de antígenos en células especializadas, a través de la ingestión de antígenos mediada por Fc [23].

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son los responsables de la muerte del melanocito, han sido activados mediante el reconocimiento del complejo TCR/MHC-I-péptidos de proteínas del melanocito [3,6,7,23]. Como ya se mencionó, existen diferentes proteínas del melanocito que son reconocidas como antígenos por el sistema inmune, una de las más importantes es la TYR, la cual puede ser reconocida tanto por el linfocito CD8<sup>+</sup> como por autoanticuerpos [17,18,23].

### 2.1.3. Tratamiento del vitiligo

En la Tabla 2 se presentan algunos tratamientos utilizados en vitiligo, el cual está dirigido a reestablecer la integridad funcional del melanocito, promoviendo la repigmentación de las áreas afectadas [8]. La repigmentación de las lesiones puede ocurrir de diferentes maneras, ya sea por la migración de melanocitos funcionales desde los folículos pilosos, por la inducción de la melanogénesis en los melanocitos remanentes de las áreas afectadas o por la estimulación de la mitosis, crecimiento y diferenciación de nuevos melanocitos [5]. Algunos fármacos inmunomoduladores han sido utilizados para el tratamiento de vitiligo no segmentado, los más utilizados son el tacrolimús y pimecrolimús. El tacrolimús es una opción que ha demostrado ser efectiva, aunque en estudios con un número de pacientes infantiles, el estudio más extenso incluyó 90 pacientes, por lo cual, es necesario una evaluación con un número mayor para comprobar la total eficacia de este antibiótico del grupo de los macrólidos [24].

**Tabla 2.** Diferentes tratamientos para el vitiligo [5].

<b>Tratamiento</b>	<b>Medicamento o técnicas empleadas</b>
Corticosteroides tópicos	Clobetasol, triamcinolona e hidrocortisona
Fotoquimioterapia	Luz UVA y psoralenos (8-metoxipsoraleno), khelina o fenilalanina oral
Fototerapia con luz UVB de banda ancha y estrecha con antioxidantes	Catalasa, pseudocatalasa, superóxido dismutasa, vitaminas E y C, ácidos grasos poliinsaturados
Excimer laser	Se recomienda combinarlo con inmunomoduladores tópicos como el tacrolimús
Inmunomoduladores tópicos	Tacrolimús y pimecrolimús
Procedimientos quirúrgicos	Injertos celulares de queratinocitos y melanocitos no cultivados e injerto de piel
Despigmentación permanente e irreversible	Monobenciléter de hidroquinona al 20 %
Cosmético	Microtatuajes o cosméticos

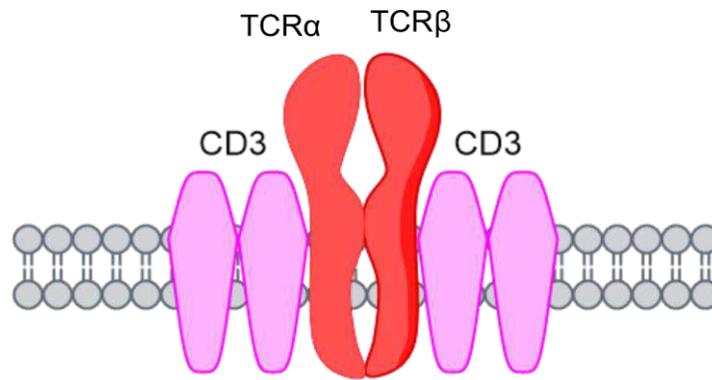
La fototerapia y fotoquimioterapia requieren tiempo y disminuyen la productividad laboral del paciente, los esteroides tópicos no son prácticos en lesiones de área grande ya que se corre el riesgo de absorción sistémica, los inhibidores tópicos de la calcituria son costosos y menos efectivos que los tratamientos orales [25]. Desafortunadamente, estos tratamientos no son totalmente efectivos y presentan limitaciones, como el tiempo de tratamiento en el caso de la fototerapia y fotoquimioterapia, riesgo de efectos secundarios, para los corticosteroides y altos costos, tal es el caso del tacrolimús y pimecrolimús.

## **2.2. Blancos Moleculares de Interés en Vitiligo.**

Como se ha visto, el vitiligo es un trastorno con una etiología compleja lo cual dificulta encontrar un tratamiento eficaz. En la búsqueda de nuevas moléculas que puedan servir de utilidad para el tratamiento de este trastorno, es necesario localizar dianas biológicas, también llamados blancos moleculares, que puedan ser investigadas con este propósito.

### **2.2.1. Receptor Para el Antígeno de Linfocitos T (TCR)**

La destrucción del melanocito es mediada por la acción de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> melanocitotóxicos, los cuales reconocen antígenos del melanocito mediante el complejo TCR/MHC-I-epítotope [3,6,7,23]. El TCR es una estructura conformada por dos cadenas proteicas, el más común es el TCR  $\alpha\beta$  conformado por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ , se expresa en la mayoría de los linfocitos T circulantes, en menor medida el TCR puede estar conformado por las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ , dando como resultados TCR  $\gamma\delta$ , además, el TCR se asocia de manera no covalente con proteínas accesorias (CD3) que permiten intensificar la señalización del receptor hacia la célula (Figura 3) [26–28].



**Figura 3.** Estructura general del TCR. La región constante del TCR está anclado a membrana y la región variable se posiciona hacia la zona extracelular permitiendo la interacción y reconocimiento del antígeno.

Cada cadena se constituye por dos regiones, una región constante y una región variable; la región variable es la responsable del reconocimiento de los antígenos y la posterior expansión clonal y diferenciación hacia linfocitos de memoria o citotóxicos. La variabilidad de las cadenas se da por reordenamientos en los genes de la línea germinal (genes lineales) de los segmentos V (variable), D (diversidad) y J (unión), en donde por un proceso llamado recombinación V(D)J, la unión de los diferentes segmentos es totalmente aleatoria [26,29].

Existen diferentes proteínas del melanocito que se reconocen como antígenos por el sistema inmune, una de las más importantes es la tirosinasa (TYR) [17], enzima fundamental en la síntesis de melanina [18,23]; de esta manera, una sola clona de linfocitos serán reactivos a TYR, así como una clona diferente será reactiva a un complejo MHC-epítotope diferente. La inhibición del reconocimiento TCR-MHC-péptido permitiría disminuir la muerte del melanocito; sin embargo, debido a la gran variabilidad de TCR y por lo tanto a la alta especificidad en el reconocimiento de un solo antígeno, el uso de las técnicas computacionales como el acoplamiento molecular y el análisis farmacofórico, se verán limitadas dado a la cantidad de información relevante disponible.

### 2.2.2. Inhibición de la Quimiotaxis

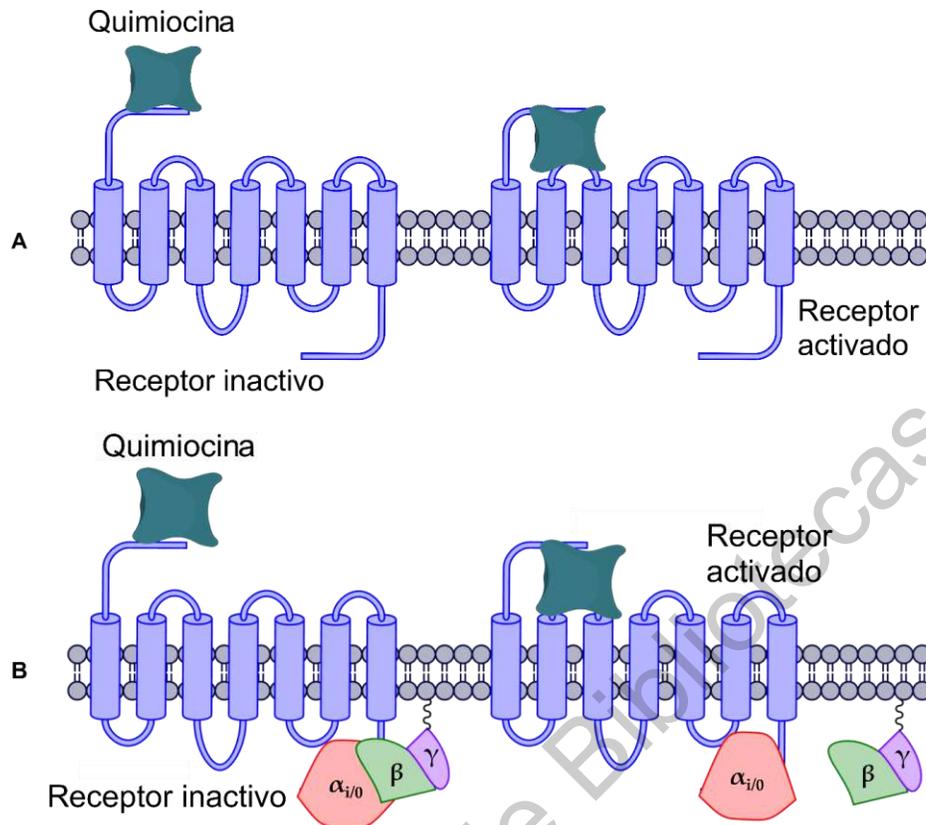
La activación de los linfocitos T por el reconocimiento del antígeno promueve la migración hacia los sitios de infección, inflamación o daño. Diferentes proteínas participan en la movilidad de las células del sistema inmune o quimiotaxis. La quimiotaxis está coordinada principalmente por la acción de proteínas pequeñas llamadas quimiocinas de aproximadamente 8-15 KDa [4,30]. Dependiendo del tipo celular y los ligandos disponibles migrarán las células hacia un sitio específico. Para la entrada de nódulos linfáticos de linfocitos vírgenes la participación de la L-selectina es requerida para su unión a la adhesina de nodo periférico (PNAd) y del receptor a quimiocinas CCR7, cuyo ligando es CCL19. Los ligandos de E-selectina y P-selectina (ESL y PSL, respectivamente) son requeridos para la entrada de los linfocitos T a piel inflamada, algunos autores mencionan la dependencia de CCR7 en CD4<sup>+</sup> para la migración, aunque otros indican que se depende más de los receptores CCR10 para

CD4<sup>+</sup> y de CXCR3 para CD8<sup>+</sup>. Se ha reportado en pacientes con vitiligo la sobreexpresión de CXCR3 (*C-X-C Chemokine Receptor 3*) y CXCR6 (*C-X-C Chemokine Receptor 6*) y sus respectivas quimiocinas; CXCL9 (*C-X-C Ligand 9, Monokine induced by gamma interferon, MIG*), CXCL10 (*C-X-C Ligand 10, Interferon induced protein of 10KDa, IP-10*) y CXCL11 (*C-X-C Ligand 11, Interferon inducible T-cell alpha chemoattractant, I-TAC*) ligandos de CXCR3 y CXCL16 (*C-X-C Ligand 16, SPOX*), único ligando de CXCR6 [31–36]. Los dos receptores anteriormente mencionados son dianas biológicas relevantes para la búsqueda de nuevas moléculas en el tratamiento del vitiligo.

#### 2.2.2.1. C-X-C Receptor a Quimiocina 3

El receptor a quimiocinas CXCR3 pertenece a la familia de receptores CXC, los cuales reconocen a quimiocinas que presentan en su estructura un acomodo específico de las primeras dos cisteínas en la secuencia (C-X-C, donde X es cualquier aminoácido). Es un receptor de tipo GPCR (*G-Protein Coupled Receptor*, receptor acoplado a proteínas G) con tres isoformas obtenidas por *splicing* alternativo; CXCR3A (342 a.a.) la isoforma más común en las células que lo expresan, CXCR3B (451 a.a.) y CXCR3-alt (267 a.a.). Se ha reportado la expresión selectiva de estas isoformas en diferentes patologías como cáncer, endometriosis y enfermedad de Crohn [37–39]. Los ligandos naturales de CXCR3 son las quimiocinas CXCL9, 10 y 11 las cuales presentan diferentes afinidades con el receptor siendo CXCL11 la más afín seguida de CXCL10 y CXCL9. CXCR3 expresa en linfocitos CD4<sup>+</sup><sub>th1</sub> y CD8<sup>+</sup>, la expresión de sus ligandos es dependiente de IL-2 e IFN- $\gamma$  [25,40]. La activación de CXCR3 promueve la movilización de Ca<sup>2+</sup> resultando en la quimiotaxis de las células del sistema inmune [25]. CXCR3A es un receptor acoplado a una proteína G (GP) con subunidad  $\alpha_{i/o}$ , esta isoforma y sus ligandos se sobreexpresa en vitiligo y otras patologías de naturaleza inflamatoria y diferentes tipos de cáncer [41,42]. Por otro lado, se ha reportado la expresión de CXCR3B en melanocitos mediando la apoptosis del melanocito por estímulo de CXCL10 liberado por células linfoides innatas en etapas tempranas de vitiligo esta isoforma se acopla con una G $\alpha_s$  y con la señalización mediada por  $\beta$ -arrestinas [37–39].

Se han propuesto un modelo de dos pasos para la activación de los receptores a quimiocinas; 1) La interacción de la quimiocina con el amino terminal (NH<sub>2</sub>-T) y 2) la orientación dirigida hacia a los *loops* extracelulares (ECLs) y segmentos transmembranales (TMs) promoviendo cambios conformacionales en el receptor [43–45]. Complementando esta teoría, nosotros proponemos que el receptor interactúa con la quimiocina y se orienta hacia los segmentos transmembranales promoviendo los cambios conformacionales en el receptor siendo este el paso número 1, posteriormente, los cambios conformacionales promueven el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de la GP y liberando el complejo  $\beta\gamma$ , siendo este el paso número 2 (Figura 4) [4].



**Figura 4.** Modelo de activación en dos pasos de CXCR3. A) Modelo clásico; 1) la quimiocina interactúa con el NH<sub>2</sub>-T, 2) la quimiocina se orienta hacia los ECLs y TMs provocando cambios conformacionales que activan al receptor, B) Modelo propuesto; 1) La quimiocina interactúa y se orienta a los ECLs y TMs provocando los cambios conformacionales, 2) los cambios conformacionales promueven el intercambio de GDP (guanosina-5'-difosfato) a GTP (guanosina-5'-trifosfato) en la subunidad  $\alpha_{i/0}$  permitiendo la separación del complejo  $\beta\gamma$  [4,43–45].

En cuanto a la interacción quimiocina-receptor se ha propuesto un modelo denominado “de dos sitios” en donde el receptor reconoce el sitio de unión de la quimiocina localizado en después de las primeras dos cisteínas y posteriormente las interacciones aumentan hacia el dominio amino terminal (NH<sub>2</sub>-T) de la quimiocina activando al receptor [46]. Adicionalmente, en un estudio extenso sobre la interacción entre CXCL12 y CXCR4 se propone la existencia de un sitio alternativo al modelo de dos sitios y confirma la relevancia de las modificaciones postraduccionales (PTMs, sulfatación en los residuos de tirosina) en los receptores de la familia CXC [47].

La estructura tridimensional de CXCR3 no está resuelta por cristalografía, resonancia magnética nuclear (RMN) o crio-electromicroscopía electrónica (crio-EM); sin embargo, se ha reportado diversos modelos por homología, aunque utilizando plantillas con baja identidad de secuencia, modelos incompletos o sin considerar las modificaciones postraduccionales (PTMs) [48–50]. No obstante, estudios de mutaciones han permitido identificar residuos relevantes en la interacción con las quimiocinas y la actividad del receptor (Tabla 3).

**Table 3.** Residuos relevantes para la interacción entre CXCR3 y las quimiocinas.

Residuos	Observaciones
Residuos 1-16	Relevantes para la interacción entre el receptor y sus quimiocinas [42]
R216	Fundamental para la quimiotaxis y movilización de Ca <sup>2+</sup> , pero no para la unión de las quimiocinas [51]
Y27, Y28	La sulfatación en estos residuos es necesario para la interacción con las quimiocinas [42,47,51]
N197, N212	Esencial para la unión de CXCL10 y CXCL11 [51]
D112, D278	Relevante en la interacción de las tres quimiocinas, pero solo en CXCL10 y 11 tiene influencia en la actividad [51]
D282, E293	Influencia en la actividad de CXCL9 y 10 y en la interacción de CXCL11 [51]

Los GPCRs de clase A, como lo es CXCR3, presentan regiones altamente conservadas entre los integrantes de la familia, como el caso de la secuencia “DRY” la cual contiene una interacción iónica entre el residuo aspartato (D) y arginina (R), comúnmente llamada “jaula de arginina” o *arginine cage*. Esta interacción de tipo puente salino se relaciona con el balance entre el estado inactivo-activo de los GPCRs, se ha propuesto que, cuando la interacción se pierde el residuo de arginina puede interactuar con otros TMs y con la subunidad  $\alpha$  de la GP estabilizando el estado activo del receptor [52–58].

En años recientes se han sintetizado antagonistas a este receptor, obtenidos en su mayoría por cribado de alta eficiencia (*High-Throughput Screening*, HTS) y los subsecuentes métodos de optimización [59–68]. Hacia 2020, existían 894 ligandos reportados como antagonistas en la base de datos publica ZINC [69]. Sin embargo, el estudio de la unión de los ligandos naturales y el mecanismo de antagonismo es limitado debido a la falta de estructura cristalográfica [70].

#### 2.2.2.2. C-X-C Receptor a Quimiocina 6

El receptor CXCR6, también conocido como Bonzo y TYMSTR es un GPCRs de clase A, presenta una secuencia no canónica compuesta por los residuos DRF, análoga a la secuencia canónica DRY, relacionada con la adhesión celular [71–73]. Además, a diferencia de CXCR3 y CXCR4 la inhibición de las modificaciones postraduccionales como la sulfatación y glicosilación no influye en la actividad del receptor [35,55].

El único ligando natural para CXCR6 es la quimiocina CXCL16 (SR-POX). Es una quimiocina de 254 a.a., la cual junto a CX<sub>3</sub>CL1 (Fractalkine), presenta una forma soluble (CXCL16s) y una forma anclada a membrana (CXCL16m) [74,75]. CXCL16 se expresa en células del sistema inmune, queratinocitos y células endoteliales [73,76]. Esta quimiocina se conforma de una región citosólica, una transmembranal y una región de tipo quimiocina. La isoforma membranal funciona como un receptor para lipoproteínas de baja densidad (LDL), fosfatidilcolina y sulfato de dextrano, ayuda a la fagocitosis de bacterias, y promueve la adhesión celular de células del sistema inmune. CXCL16m

es escindida por las metaloproteasas ADAM10 y ADAM17 [77–79], obteniéndose la contraparte soluble, CXCL16s, cuyo principal efecto es la quimiotaxis [74,80].

El eje CXCR6-CXCL16 está involucrado en diferentes procesos patológicos, esta sobre expresado en diferentes tipos de cáncer; próstata, mama, ovario, pulmón y schwannomas, en donde promueve metástasis; también participa en aterosclerosis, diabetes tipo I, trombocitopenia, vitiligo y otras enfermedades autoinmunes, donde es responsable de la infiltración y permanencia de diferentes células del sistema inmune [33,81–87]. La estructura de CXCR6 y CXCL16 no está resuelta por cristalografía, RMN o crio-EM; sin embargo, se han reportado modelos por homología del receptor utilizando CXCR4 y CCR5 como plantilla con la intención de elucidar el mecanismo de activación e interacciones con CXCL16 [55,73]. Por mutaciones dirigidas se han identificado residuos importantes como lo son D176 y E274 los cuales son fundamentales en la unión de CXCL16s y E274 para la activación de quimiotaxis en el receptor, mutaciones en E274 aumentan la adhesión celular, indicando que CXCR6 es capaz de discriminar entre la forma soluble y la forma membranal de CXCL16 [35]. No obstante, aún queda mucho por investigar sobre la activación de CXCR6 por CXCL16s y CXCL16m. En 2020, se reportaron los primeros antagonistas sintéticos de CXCR6 obtenidos por HTS y procesos de optimización del núcleo *exo*-[3.3.1]-azabiclononano, con resultados prometedores de algunas moléculas sintetizadas siendo la mejor la molécula 81 con un  $EC_{50}=402$  nM [36].

Recientemente se reportó la cristalografía por crio-EM del complejo CCR6-CCL20 (PDB: 6WWZ), lo que puede ser un herramienta útil para futuros modelados de los complejos receptor-quimiocinas, el modo de unión de CCL20 con CCR6 se realizó por reensambles de las conformaciones observadas para los complejos CXCR4/vMIP-II y US28/CX3CL [88].

Los linfocitos CD8<sup>+</sup> melanocitotóxicos de pacientes con vitiligo presentan una sobreexpresión de CXCR3 en comparación con linfocitos CD8<sup>+</sup> de pacientes sanos, así como una mayor expresión de CXCL10 en piel y suero. En un modelo animal se corroboró la participación de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10, ligandos del receptor a quimiocinas CXCR3. Este eje promueve la migración de linfocitos CD8<sup>+</sup> hacia la epidermis donde se encuentra el melanocito. Por otro lado, la expresión de CXCR6 y se encuentra elevada en pacientes linfocitos y queratinocitos de pacientes con vitiligo [25,32,89,90].

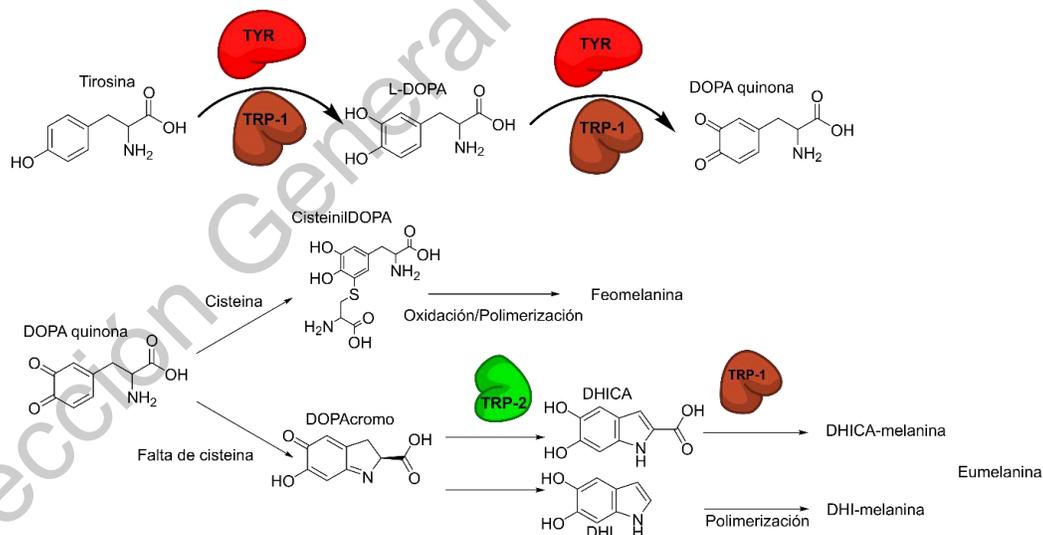
El bloqueo de los ejes CXCR3-CXCL10 y CXCR6-CXCL16 por antagonismo del receptor se presenta como una alternativa interesante para el desarrollo de nuevas moléculas pequeñas que puedan antagonizar estos receptores y, por tanto, disminuir la quimiotaxis y permanencia de linfocitos melanocitotóxicos en vitiligo y en otros procesos autoinmunológicos.

### 2.2.3. Estimulación de la Melanogénesis

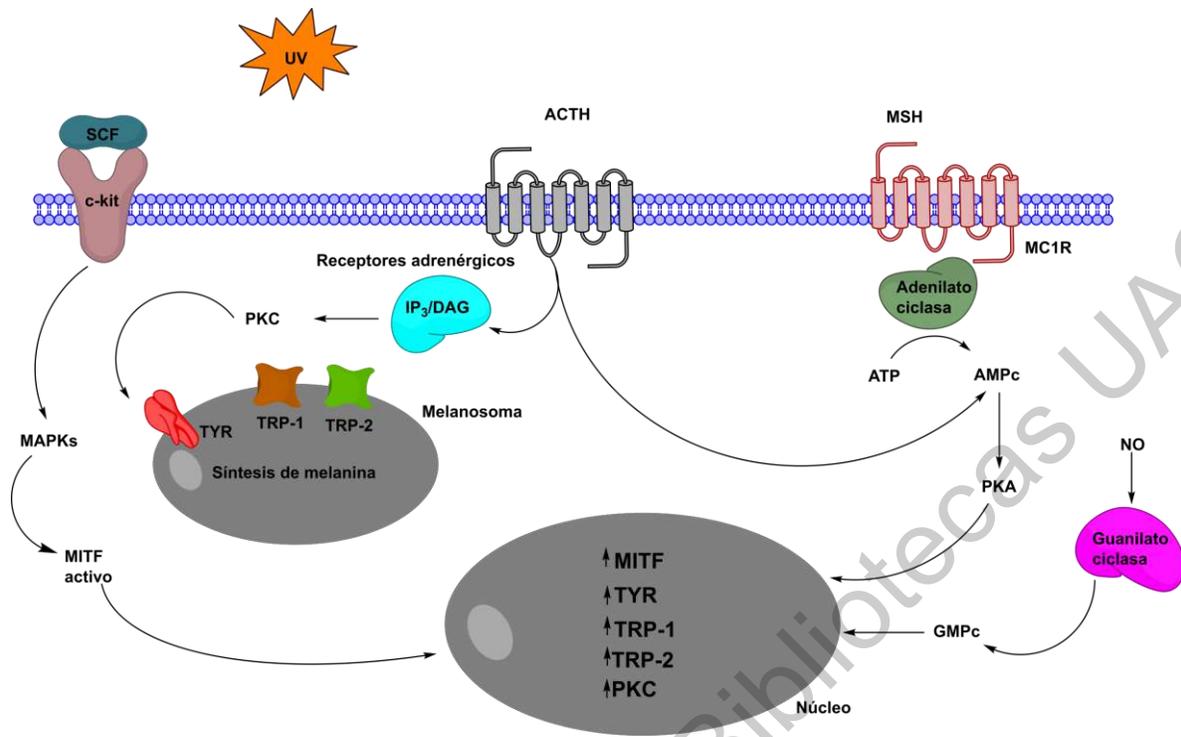
Debido a que el tratamiento para el vitiligo radica en la promoción de la repigmentación mediante la estimulación de melanogénesis, comprender el proceso de síntesis de melanina es relevante en la terapéutica del trastorno. La melanogénesis es un proceso complejo que involucra diferentes

proteínas, se lleva a cabo en organelos específicos llamados melanosomas [91]. Se han reportado alrededor de 125 genes responsables de la síntesis de melanina [92]. Este proceso se realiza en los melanosomas debido a la alta producción de ROS, como quinonas y  $H_2O_2$ , moléculas tóxicas para el melanocito [93]. Los melanosomas son parte importante de la protección contra los rayos ultravioleta debido a que migran por las dendritas del melanocito hacia los queratinocitos, por medio de unos complejos llamados glóbulos del pigmento [91]. Existen dos tipos de melanina, la eumelanina y la feomelanina, cuya síntesis depende de las enzimas y sustratos presentes en el melanosoma. La eumelanina, conocida como melanina insoluble, presenta una coloración marrón-negra, mientras la feomelanina, conocida como melanina soluble, presenta una coloración rojo-amarillo, el objetivo primordial de la melanina es proteger a los queratinocitos de la radiación ultravioleta (UV) [93–95].

La cadena de reacciones de la síntesis de melanina (Figura 5) en primer lugar la tirosina, producida por la conversión de la L-fenilalanina a L-tirosina catalizada por la fenilalanina-hidroxilasa, es hidroxilada por la tirosinasa (TYR) hacia L-DOPA, posteriormente, la misma TYR oxida la L-DOPA a DOPA-quinona que, en caso de haber cisteína en el medio, esta reacciona y se formará cisteinil-DOPA, después, en una reacción de oxidación/polimerización se obtendrá la feomelanina. A falta de cisteína en el medio, se forma DOPA-cromo, el cual puede convertirse en 5,6-diindol (DHI) que se polimerizará para formar DHI-melanina. De igual manera, el DOPA-cromo puede actuar como sustrato de la TRP-2 y se transforma en ácido dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), donde, TRP-1 lo metaboliza y forma DHICA-melanina, ambas pertenecen a la eumelanina [95,96].



**Figura 5.** Cadena de reacciones de la melanogénesis.



**Figura 6.** Regulación intrínseca de la melanogénesis.

La melanogénesis está controlada por varios factores intrínsecos y extrínsecos. En la regulación intrínseca es un proceso complejo donde participan diversas moléculas y vías de señalización (Figura 6). Puede iniciar debido al estímulo de los queratinocitos contra la radiación UV, la cual desencadena la secreción de factores que activan al melanocito [91]. Se conocen diferentes vías en la producción de melanina, como el estímulo receptor a melanocortina 1 (MC1-R) por la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y la hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH), ambos son péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC) los cuales son producidos por melanocitos y queratinocitos. De igual manera, moléculas como la endotelina-1 (ET-1), el factor de células madre (SCF), algunos mediadores de la inflamación como prostaglandinas y leucotrienos, las neutrofinas o factor neutrófico (NTs), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el cual es secretado por los fibroblastos y el óxido nítrico (NO) entre otros [91,93,97,98]. Cuando MC1-R es activado, se produce un incremento intracelular de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), lo que activa a la PKA, que fosforila factores de transcripción como CREB, y promueve la producción del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) y enzimas melanogénicas [99]. Por otra parte, la activación de los receptores adrenérgicos por agonistas como norepinefrina y estrógenos, promueven la expresión de enzimas melanogénicas y por tanto la melanogénesis, mediante la producción de inositol trifosfato y diacilglicerol (IP<sub>3</sub>/DAG) que activan a la PKC- $\beta$ , la cual fosforila a la TYR, en la membrana del melanosoma [100]. Cuando hay altos niveles de  $\alpha$ -MSH, se promueve la producción de eumelanina; por el contrario, cuando los niveles de  $\alpha$ -MSH son bajos, se promueve la producción de feomelanina [95]. El óxido nítrico puede activar la melanogénesis promoviendo la

acción de la enzima guanilato ciclasa (GC), obteniendo GMPc (monofosfato cíclico de guanina), que promueve la fosforilación de algunos factores de transcripción y se aumenta la síntesis de enzimas melanogénicas [91]. La activación de la vía metabólica por el complejo C-kit/SCF promueve la actividad de la vía de las MAPK (MAP cinasas) que activará MITF, promoviendo la síntesis de enzimas melanogénicas [98].

Adicionalmente, los queratinocitos tienen gran influencia sobre los melanocitos, ya que pueden secretar diversos factores como Foxn-1, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Estos factores, activan diferentes vías de señalización que regulan la pigmentación; adicionalmente, se ha propuesto la producción en queratinocitos de endocannabinoides a causa de la radiación UV y, por medio de señalización paracrina del receptor a cannabinoides tipo 1, se regula negativamente la síntesis de melanina [95,98,101].

La regulación extrínseca de la melanogénesis está controlada por la exposición a los rayos UV, los cuales aumentan la proliferación y/o reclutamiento de los melanocitos, el número de dendritas y la transferencia de los melanosomas. Es importante mantener la protección dada por la melanina ya que la UV de tipo B (280-320 nm) es absorbida directamente por el DNA, lo que conduce a una formación de fotoproductos, como los dímeros de timina y pirimidina. La proteína de supresión tumoral p53 juega un papel importante en el daño al DNA producido por la radiación UV. P53 induce la expresión y liberación de POMC y HNF-1 $\alpha$  (Factor nuclear de hepatocitos 1 $\alpha$ ) en queratinocitos, esto da como resultado la producción de eumelanina que confiere mejor fotoprotección que la feomelanina. La p53 promueve en el melanocito, la producción de  $\alpha$ -MSH e induce el aumento de Bcl-2, además participa en la reparación del DNA para evitar el daño causado por la radiación UV [95].

#### 2.2.4. *Tirosinasa*

La tirosinasa es una glicoproteína enzimática, oxidasa dependiente de Cu<sup>2+</sup>, localizada en la membrana del melanosoma cuyo sustrato es la tirosina y cataliza la conversión de L-tirosina en L-DOPA iniciando la cascada de reacciones involucradas en la melanogénesis. Posee tres dominios, un dominio melanosomal, uno transmembranal y uno citoplasmático [92]. El dominio citoplasmático, facilita el transporte de la enzima desde el núcleo hasta el melanosoma, el dominio melanosomal contiene la región catalítica, los cuales están compuestos por residuos de histidina dependientes de cobre [95]. Si el cobre es oxidado la enzima se inactiva; sin embargo, donadores de electrones como la L-DOPA, óxido nítrico (NO), ácido ascórbico y anión superóxido pueden reactivar a la TYR [14]. Es importante para la función de la TYR, la fosforilación de sus residuos de serina en su dominio citoplasmático por la PKC- $\beta$  [102]. La TYR también puede ser indirectamente activada por la tirosina hidroxilasa y por la fenilalanina hidroxilasa, ya que esta última cataliza la conversión de L-fenilalanina a L-tirosina [91].

TYR pertenece a la familia de enzimas dependientes de cobre tipo 3, contiene un sitio catalítico compuesto por seis residuos de histidina coordinados con dos átomos de Cu<sup>2+</sup>. La TYR puede

encontrarse en diferentes estados de oxidación durante el proceso de catálisis, en la forma nativa (met) puede encontrarse a los  $\text{Cu}^{2+}$  en coordinación con iones  $\text{HO}^-$ , esta forma luego se somete a oxidación para obtener un estado desoxi-inactivo donde la valencia de los  $\text{Cu}^{2+}$  pasa a ser  $\text{Cu}^+$  y están en coordinación con moléculas de agua. Para ser activada, el estado desoxi necesita que los cobres se coordinen con una molécula de oxígeno lo que promueve el cambio a un estado oxi-activo, donde los  $\text{Cu}^+$  ahora son  $\text{Cu}^{2+}$ , esta forma es capaz de unir y oxidar monofenoles y catecoles. La TYR es inactivada generalmente por moléculas que reconocen el estado met de la enzima, por ejemplo, los iones halogenuro. Podemos entonces reconocer, al menos, dos estados de la enzima, el estado inactivo donde los cobres están en complejo con  $\text{H}_2\text{O}$  y el estado activo donde los iones de cobre están en complejo con  $\text{O}_2$ . La estructura de la TYR no está resuelta por cristalografía, RMN o crio-EM; sin embargo, se han reportado algunos modelos por homología sobre todo para estudiar la reacción de oxidación que realiza esta enzima [103]. Al ser una enzima clave en la melanogénesis la TYR es un potencial blanco farmacéutico para la terapéutica del vitiligo, mediante la activación y posterior promoción de síntesis de melanina. En 2011 se reportó una serie de compuestos derivados de chalconas que presentaron un efecto activador en la tirosinasa de plátano con el objetivo de inhibir la actividad de las enzimas polifenol oxidasas; sin embargo, de manera fortuita, se obtuvo una serie de compuestos que fueron activadores de la enzima tirosinasa. Posteriormente, los autores exploraron la capacidad de las chalconas para activar tirosinasa como un posible tratamiento de vitiligo, sintetizando chalconas con anillos de isoxazol o derivados de furanocumarinas [104–106], por otro lado, se evaluó la capacidad de las auronas (flavonoides) en la activación de la tirosinasa para la producción de melanina [107]. Estos reportes permiten considerar la estimulación de la tirosinasa como una vía para el tratamiento del vitiligo promoviendo la repigmentación de las lesiones.

### **2.3. Diseño de Fármacos Asistido por Computadora**

El uso de técnicas computacionales provee un marco de referencia para el diseño de moléculas con actividad biológica, donde tres factores deben ser tomados en cuenta: el primero es la selección de descriptores los cuales son propiedades de las moléculas y existen más de 5000 descriptores; el segundo es el *score* el cual funciona para poder comparar diferentes moléculas y conformaciones estructurales; y, por último, el uso de algoritmos que permitan diferenciar un compuesto con posible actividad de uno que pudiera no ser activo [108]. Una de las técnicas más utilizadas en el diseño de fármacos es el acoplamiento molecular o *docking*, el cual es un modelo de interacción entre dos partes optimizadas y con una orientación variable, pero con geometría interna fija, lo que se conoce como *docking* rígido. Con el aumento de los recursos computacionales, se han logrado realizar modelos de interacción con cambios en las geometrías internas de las partes que interactúan, a este tipo de modelo se le conoce como *docking* semiflexible o flexible (*Induced-Fit Docking*). Además, el modelado de estructuras cuaternarias que interactúan entre sí, como lo son las interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico [109].

Es importante tener en consideración que las macromoléculas tienen la capacidad de ser más flexibles y dinámicas en su estado natural, ya que pueden sufrir cambios debidos a temperatura, pH, cargas, fosforilaciones, además de los cambios producidos por la interacción con agonistas y antagonistas, activadores e inhibidores. Técnicas computacionales como la dinámica molecular permite entender los tipos de interacciones, tipos de uniones y pequeños cambios que sufre la estructura de la macromolécula y que es fundamental para el diseño de fármacos [110].

### 2.3.1. Modelado de Proteínas por Homología

Para realizar el acoplamiento molecular es necesario tener la conformación tridimensional de las partes de interacción y en algunas ocasiones se pueden encontrar cristalografías en bases de datos como el Protein Data Bank (PDB). Sin embargo, cuando no se tiene la conformación tridimensional de la estructura a investigar, es necesario construirla, es aquí donde el modelado por homología sirve como herramienta para este problema [110].

El modelado de proteínas puede realizarse de varias formas, una de ellas es por modelado comparativo. Este compara la secuencia de aminoácidos con secuencias de aminoácidos de proteínas previamente conocidas. El método se basa en que secuencias parecidas presentan conformaciones tridimensionales similares. La precisión de los modelos depende exclusivamente de la similitud de las secuencias de aminoácidos, cuando el templado (también conocido como molde o plantilla) presenta una similitud de 50 % o más en sus secuencias, por lo general son considerados de alta precisión y se ha demostrado estar a la par de cristalografías de baja resolución. Cuando la secuencia presenta del 30-50 % de homología, se espera que el modelado mantenga en 80 % de sus carbonos dentro de un rango de 3.5 Å de su posición real. Si la homología entre secuencias es menor al 30%, generalmente se presentan errores significativos en los modelos. En general, el modelado de homología consiste en la selección de una o más plantillas a partir de una base de datos, su alineamiento con la secuencia diana, y el refinamiento de la geometría de la cadena lateral. Existen algoritmos bien establecidos e implementaciones para el primer paso, la identificación de la plantilla, el más utilizado es BLAST y para el refinamiento se utiliza PSI-BLAST, estos sirven como puntos de referencia a cualquier nuevo enfoque de modelado de proteínas [111].

### 2.3.2. Modelado de Interacciones Proteína-Proteína

Las interacciones proteína-proteína (IPP) juegan un papel importante en los procesos biológicos. El acoplamiento molecular es utilizado para estudiar este tipo de interacciones de ligandos “grandes”, en comparación con las interacciones de ligando “pequeño”, debido a los altos costos computacionales que representa realizar este tipo de acoplamiento. Sin embargo, en años recientes se ha dado mucha importancia a las interacciones proteína-proteína en la manifestación de procesos patológicos, por lo que esta herramienta puede ayudar a explicar o predecir los procesos que ocurren en las enfermedades. La construcción de redes de IPP, puede ser utilizada en el diseño de fármacos para predecir las dianas moleculares a las cuales un ligando pueda unirse, así como sus reacciones

adversas potenciales con respecto a los medicamentos relacionados. También pueden ayudar a identificar qué proteínas se verían afectados por un ligando diseñado para interrumpir una interfaz en particular, debido a que ponen de manifiesto los dominios que están implicados en las IPPs. Estas redes IPP pueden ser explotadas para el reposicionamiento de fármacos, teniendo en cuenta el uso de medicamentos aprobados conocidos o la reconsideración de las fallas en etapa tardía de evaluación [109].

### 2.3.3. Acoplamiento Molecular (*Docking*)

El método de *docking* es definido como la predicción del modo de unión y la energía de unión de un ligando (generalmente molécula pequeña) con una diana (receptor, enzima, proteína, entre otros). Existen diferentes programas especializados en realizar *dockings*, pero todos estos consisten en dos componentes principales; 1) el algoritmo de búsqueda y 2) la función de *score*; el algoritmo de búsqueda genera suficientes conformaciones de unión y la función de *score* clasifica estas conformaciones, generalmente basado en las energías de unión calculadas [112]. Esta técnica es utilizada para predecir la conformación de unión de ligando con las dianas de estudio y los resultados pueden ser utilizados para diseño de nuevas moléculas u otras técnicas como relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSAR). Los métodos de *docking* requieren la estructura tridimensional de los ligandos y las dianas, las cuales se pueden obtener por cristalografías, RMN, crio-EM y modelos por homología. Además, el *docking* puede ser utilizado, no solo para predecir la conformación de unión, sino también para la predicción del sitio de unión de un ligando en una diana, conocido como *docking* ciego, utilizado cuando se desconoce el sitio de unión [113,114].

Existen 3 principales tipos de funciones de *score*; las aproximaciones basadas en campos de fuerza (*force-field-based approaches*), las cuales intentan modelar los diferentes tipos de interacciones involucrados en la unión ligando-proteína usando parámetros y funciones físicas derivadas de datos experimentales y/o simulaciones cuánticas, las aproximaciones empíricas, en los que se utilizan métodos de regresión o aprendizaje automático (*machine learning*) para asociar la predicción deseada, normalmente la afinidad de unión de los complejos, con características generales de esos complejos, como el número de puentes de hidrógeno, y por último, los potenciales estadísticos en los que se asignan términos energéticos a características estructurales de las interacciones ligando-proteína en función de la frecuencia con la que esas características ocurren en un conjunto de entrenamiento de complejos ligando-proteína. Por otro lado, las funciones de búsqueda involucran cambios en la orientación y conformación del ligando y, en mayor o menor medida, de la proteína. El enfoque más simple de las funciones de búsqueda es el acoplamiento rígido, donde el software explora los seis grados de libertad de traslación y rotación y filtra aquellos con pobre complementariedad antes de la clasificación final. Es posible considerar la flexibilidad del ligando por el software mediante el precálculo de posibles conformaciones y acoplando de manera rígida cada conformación en la proteína de interés. Otros enfoques son aquellos en donde las posibles conformaciones se buscan sobre la marcha (*on-the-fly*) o también conocidos como método de anclaje

y crecimiento o ensamblaje (*anchor-and-grow method*), en donde el ligando es posicionado en la proteína por medio de una región rígida y desde ese enfoque empieza la búsqueda de conformaciones descartando aquellas que “choquen” con la proteína. De manera similar, existen métodos de fragmentación en donde los fragmentos rígidos del ligando se posicionan en el receptor y el software empieza la reconstrucción de posibles conformaciones [113].

Otro enfoque de la función de búsqueda es el método de acoplamiento jerárquico donde las conformaciones de baja energía se calculan previamente y se alinean de tal forma que la mayoría de los átomos estén posicionados de manera idéntica, cada conjunto de conformaciones pregeneradas se organizan basándose en la similitud de las conformaciones (clústeres), posteriormente para cada posible traslación y rotación del ligando el software filtra las conformaciones que no son posibles debido al factor estérico, este método es confiable ya que elimina aquellas conformaciones no favorables. También, existen métodos que mezclan métodos de ensamblaje y procesos de minimización utilizando métodos de tipo Monte Carlo o minimizaciones de gradiente descendente para simular los cambios conformacionales del ligando cuando se une a la proteína [113]. Por último, los métodos que exploran el espacio conformacional de los residuos clave en la proteína, utilizando métodos similares a los anteriormente señalados, por ejemplo, Autodock4 puede ajustar los enlaces rotables de los residuos y del ligando para simular los cambios conformacionales durante la unión [113,115].

#### 2.3.4. Simulaciones de Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular son una herramienta útil para el estudio de la vibración, torsión y comportamiento de los enlaces, interacciones no enlazantes (electrostáticas y fuerzas de van der Waals), lo que permite observar la evolución de un sistema bajo condiciones constantes de presión, temperatura, volumen y [116,117]. La dinámica molecular (MD) es parte fundamental del estudio de las proteínas cristalizadas, ya que permiten simular el comportamiento de una proteína en un sistema similar al nativo (membrana lipídica o citosol). En las simulaciones clásicas de MD los átomos son representados como partículas cuyo movimiento puede obtenerse resolviendo las ecuaciones de movimiento de Newton. Los modelos matemáticos utilizados para describir las interacciones entre las partículas son llamados campos de fuerza (*force field*) e incluyen cálculos que describen la vibración, torsión y comportamiento de enlaces. La MD también es utilizada para entender el comportamiento de un sistema en su función biológica, así como, relajar y estudiar modelos por homología, complejos ligando-proteína, calcular una aproximación más real de la energía de unión de un ligando con una proteína (*umbrella sampling*), estabilidad de proteínas y complejos proteína-ácidos nucleicos [117–120]. Estas técnicas son ampliamente utilizadas para el desarrollo de nuevas moléculas con posible actividad biológica, ya que permiten disminuir costos y tiempo de producción, sin embargo, no se descarta la posibilidad de fracaso pues al final de cuentas son aproximaciones obtenidas mediante cálculos, la comprobación experimental siempre debe acompañar a los métodos computacionales (la rata siempre tiene la razón).

### 3. Justificación

El vitiligo es un trastorno hipopigmentario de la piel, caracterizado por la aparición de máculas blancas desprovistas de melanocitos. Afecta alrededor del 0.5 al 2 % de la población mundial. La mayor incidencia de este desorden se presenta en la India, seguido de Japón y México. El melanocito es la célula afectada en este desorden; es una célula dendrítica responsable de la síntesis de melanina mediante el proceso de melanogénesis. La etiología del vitiligo aún no está definida en su totalidad. Sin embargo, se ha reportado la participación del sistema inmune en el desarrollo y progresión del vitiligo. Infiltrados de linfocitos han sido identificados mediante inmunohistoquímica en piel lesional de pacientes con vitiligo no segmentado. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> son los responsables de la muerte del melanocito promoviendo apoptosis, debido al reconocimiento, por parte del receptor para el antígeno (TCR), de antígenos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad I (MCH-I). Diversas proteínas del melanocito pueden ser reconocidas como antígenos por el sistema inmune como la proteína gp100, MART-1 y la tirosinasa. Esta interacción TCR-epítotope/MCH-I permite al linfocito CD8<sup>+</sup> identificar a los melanocitos y provocar su muerte. Actualmente el tratamiento disponible está dirigido a promover la repigmentación de las lesiones y algunos al tratar el componente autoinmune; sin embargo, los tratamientos actuales no presentan resultados satisfactorios y presentan dificultades: la fototerapia y fotoquimioterapia son efectivas para la repigmentación, pero no tienen influencia en el control de la actividad del sistema inmune y requieren tiempo, lo cual disminuye la productividad de la persona; mientras que los esteroides tópicos no son efectivos en lesiones extensas y los inmunomoduladores tópicos son costosos.

Los ejes de señalización CXCR3-CXCR10 y CXCR6-CXCL16 son importantes en la patogénesis y progresión de la enfermedad. Se han reportado en modelos animales que las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 participan en la quimiotaxis de los linfocitos CD8<sup>+</sup>; además, existe una sobreexpresión de CXCR3 en linfocitos perilesionales de pacientes con vitiligo comparados con pacientes sanos. Se reportó que CXCL10 participa en la migración y capacidad efectora de los linfocitos CD8<sup>+</sup>, en un modelo animal donde inhibieron la expresión de CXCL9 y CXCL10. Los resultados indicaron que al no expresar CXCL9 o neutralizarlo mediante anticuerpos monoclonales, los linfocitos migraban hacia la epidermis y ejercían su efecto apoptótico; en contraste, cuando se inhibía o neutralizaba CXCL10, los linfocitos migran hacia la epidermis sin ejercer su efecto apoptótico, indicando que CXCL9 y CXCL10 son quimiocinas importantes para el reclutamiento de linfocitos CD8<sup>+</sup> en la epidermis, pero solo CXCL10 es fundamental para la capacidad efectora. De manera similar, CXCL16 es liberada por queratinocitos del microambiente lesional estimulados por la respuesta a proteínas mal plegadas del melanocito (derivada de un desbalance en las especies reactivas de oxígeno), promoviendo la migración de linfocitos CD8<sup>+</sup>. En ese sentido, hay estudios donde se ha reportado un incremento en la concentración de CXCL16 en piel lesional de pacientes con vitiligo comparados con pacientes sanos. Por otra parte, un blanco también importante es la tirosinasa, enzima responsable de iniciar la cadena de reacciones para la síntesis de melanina; en años recientes se ha reportado la síntesis

de moléculas capaces de activar esta enzima, entre éstas, derivados de chalconas que estimulaban la actividad de la tirosinasa.

Debido a la naturaleza multifactorial del vitiligo, la terapéutica actual es insuficiente para tener un remedio eficaz debido a que se aborda sólo un factor determinante en este padecimiento, provocando que la terapéutica sea polifarmacológica por tiempo prolongado, incrementando los costos y disminuyendo la disposición del paciente a seguir el tratamiento. Una forma de mejorar estos tratamientos es intervenir en varios procesos biológicos que sean relevantes en la manifestación de la enfermedad, utilizando fármacos multidiana. En ese sentido, el diseño y síntesis de moléculas antagonistas de los receptores CXCR3, CXCR6 y de moléculas que activen de manera alostérica la tirosinasa, utilizando técnicas computacionales como modelado por homología, acoplamiento y dinámica molecular, pueden contribuir en el tratamiento eficaz del vitiligo inhibiendo la migración de CD8<sup>+</sup> hacia la epidermis, disminuyendo la muerte del melanocito, y estimulando la melanogénesis para promover una repigmentación.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

#### **4. Hipótesis**

Los modelos computacionales de los receptores CXCR3 y CXCR6 y de la enzima tirosinasa, contruidos por modelado por homología usando como referencia estructuras de un porcentaje de identidad de secuencia mayor al 35% y simulados en diferentes condiciones por dinámica molecular, presentarán cambios conformacionales relacionados con el proceso de activación de estas proteínas que se relacionarán con el movimiento de aminoácidos específicos.

#### **5. Objetivo general**

Estudiar el comportamiento de CXCR3 y CXCR6 en complejo con sus respectivas quimiocinas y de la enzima TYR con activadores alostéricos mediante técnicas computacionales para identificar residuos claves que permitan el diseño de moléculas con potencial antagonista de los receptores CXCR3, CXCR6 y activadores alostéricos de la TYR.

##### **5.1. Objetivos particulares**

###### *5.1.1. Estudio computacional de la interacción de CXCR3 y CXCR6 con sus quimiocinas, y de TYR con activadores e inhibidores alostéricos*

- Construir, usando modelado por homología, la estructura de las proteínas CXCR3, CXCR6 y TYR.
- Estudiar la activación de los receptores CXCR3 y CXCR6 por estímulo de sus respectivas quimiocinas utilizando acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular.
- Estudiar los sitios de unión e interacciones de activadores alostéricos con TYR

###### *5.1.2. Construcción de modelos generales de interacciones proteína-ligando*

- Proponer un modelo general de interacciones proteína-ligando de los antagonistas de CXCR3 y CXCR6.
- Proponer un modelo general de interacciones proteína-ligando de los activadores alostéricos de TYR.

## 6. Metodología

A continuación, se describen los procedimientos generales utilizados en este trabajo, para posteriormente describir la aplicación de estas metodologías para cada uno de los sistemas estudiados.

### 6.1. Estructuras de las Proteínas y Modelado por Homología

Todas las secuencias de aminoácidos para los modelos por homología fueron obtenidas de la base de datos UniProt [75]. El modelado de las proteínas se realiza mediante los programas computacionales de licencia abierta I-TASSER [121–123]. En el caso de las estructuras de CXCL10, CXCL11 y las subunidades  $\beta\gamma$  de la GP fueron obtenidas de la base de datos PDB.

### 6.2. Modelo por Homología de CXCR3, CXCR6, CXCL9, CXCL16s, GP $\alpha_{i/o}$ y TYR

Para obtener los modelos por homología, las secuencias de aminoácidos obtenidas de UniProt de CXCR3 (P49682), CXCR6 (O005774), CXCL9 (Q07325), CXCL16s, región quimiocina 32-107 a.a. (Q9H2A7), GP  $\alpha_{i/o}$  (P04899) y TYR (P14679) fueron cargadas en el servidor web I-TASSER, utilizando el módulo general para el caso de las quimiocinas, GP  $\alpha_{i/o}$  y TYR, y el módulo GPCR-I-TASSER para los receptores [121–124]. Una vez obtenidos los modelos por homología se evaluó la calidad del modelo en el servidor web Molprobit [125]. En el caso particular de TYR se modelaron las tres regiones de la enzima por separado y posteriormente se unieron manualmente para la construcción del modelo final. Las estructuras de CXCL10, CXCL11 y las subunidades  $\beta\gamma$  de la GP fueron obtenidas de la base de datos PDB con código PDB 1LV9 [126], 1RJT [43] y 6G79 [127], respectivamente. Para la construcción de los modelos por homología de CXCR3, CXCR6, CXCL9, CXCL16s y la región melanosomal de TYR se realizó un alineamiento de secuencia usando el servidor BLAST para encontrar la secuencia con el mejor porcentaje de identidad, siendo CCR5 para el caso de CXCR3 y CXCR6, CXCL12 para CXCL9, CCL20 para CXCL16s y TRP-2 para tirosinasa [128,129].

### 6.3. Simulaciones de Dinámica Molecular All-Atom y Coarse-Grained

En las simulaciones de dinámica molecular *all-atom* (AA-MD) representan todos los átomos de las proteínas en el sistema, es decir, cada átomo de cada residuo es considerado una esfera, aplicándose a todos los residuos de las proteínas de estudio. Por el contrario, las simulaciones de dinámica molecular *coarse-grained* (CG-MD) consideran a cada residuo de la proteína como una esfera, aplicándose a todos los residuos de las proteínas de estudio, haciendo el cálculo más rápido, pero perdiendo información sobre el comportamiento de detalles estructurales finos.

Los sistemas para las AA-MD fueron construidos en el servidor web CHARMM-GUI, adicionando las PTMs y puentes disulfuro de las proteínas de estudio [130,131]. Este servidor web es útil para facilitar la construcción de sistemas de dinámica molecular; sin embargo, no tiene parametrizados todas las PTMs o todos los metales que pueden estar presentes en una proteína. En el caso de las

sulfataciones de CXCR3, CHARMM-GUI los parámetros no están disponibles en el servidor, por lo que se decidió utilizar fosforilaciones para generar un ambiente electrostático similar [4]. Para el caso de la TYR, el servidor no cuenta con los parámetros del  $\text{Cu}^{2+}$ , por lo que se decidió utilizar átomos de  $\text{Zn}^{2+}$  ya que presentan un radio atómico similar y TRP-2, una enzima dependiente de zinc que presenta un alto porcentaje de identidad de secuencia y que sirvió para la construcción del modelo por homología de la estructura de TYR.

Las simulaciones MD de los receptores, las quimiocinas y TYR- $\text{Zn}^{2+}$  fueron realizadas en Gromacs 2018.7 [132,133], utilizando un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a 1 atm de presión y 310.15 K empleando un acoplamiento de temperatura y cambios de escala de velocidad en un término estocástico [134] y un baróstato de tipo Parrinello-Rahman [135]. Los sistemas fueron sometidos a 5000 pasos de minimización de manera descendiente seguido de 6 pasos de equilibrio reduciendo constantes de fuerza en un esquema sugerido por el servidor CHARMM-GUI, previo a las simulaciones de producción. Para las moléculas de agua se utilizó un modelo de tres puntos (TIP3), para las membranas lipídicas se utilizó fosfatidilcolina (POPC) y se adicionaron los iones correspondientes utilizando NaCl a 0.15 M. Los módulos “distance”, “RMSD”, “RMSF” y “cluster” de Gromacs 2018.7 se utilizaron para obtener los datos de análisis en las dinámicas, mientras que para las conformaciones más relevantes se utilizó el algoritmo “gromos” [136]. Para CXCL9 y CXCL16s se utilizó el módulo “Solution Builder” de CHARMM-GUI. En todos los sistemas se utilizó el campo de fuerza CHARMM36.

Las simulaciones AA-MD TYR- $\text{Cu}^{2+}$  se realizó en el módulo Desmond de Schrödinger Maestro [137,138]. El sistema se construyó en el módulo “System Setup” utilizando el campo de fuerza OPLS, adicionando una membrana de POPC, NaCl (0.15 M), un modelo de agua polarizable de tres puntos (TIP3), en un ensamble NPT a 310.15 K y 1.01325 bar de presión. Una vez obtenido el sistema, el protocolo de relajación consistió en incrementar la temperatura y disminuir las restricciones de movimiento utilizando un baróstato Berendsen y un termostato Lagenvin. El paso de producción utilizó los algoritmos de Nose-Hoover como termostato y de Martyna-Tobias-Klein como baróstato. El clúster más representativo se obtuvo en el módulo de Desmond “Trajectory Clustering” y el análisis de las trayectorias en el módulo “Simulations Interactions Diagram” en Schrödinger Maestro [139]. Para el caso de las CG-MD, los sistemas se construyeron en el módulo “Martini Maker” de CHARMM-GUI [140], utilizando el campo de fuerza Martini2.2p en un ensamble NPT a 1 atm de presión y 310.15 K, de temperatura, se adicionó una membrana de POPC, fue usado 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 los pasos de equilibrio y minimización recomendados por el servidor, similares a los necesarios en las AA-MD, previo al paso de producción.

## **6.4. Activación de los receptores CXCR3 y CXCR6, y de la activación alostérica de la enzima TYR.**

### **6.4.1. Activación de CXCR3**

#### **6.4.1.1. Relajación de los Modelos por Homología**

Para el receptor CXCR3 se realizó una simulación AA-MD de 50 ns y para CXCL9 una simulación AA-MD de 5 ns.

#### **6.4.1.2. Construcción y relajación del Complejo CXCR3-GP**

Una vez relajados los modelos por homología, se adicionó la proteína  $G_{i/o}$ , primero se realizó un alineamiento del cluster1 de CXCR3 con la cristalografía del receptor 5HT1A (PDB: 6G79), el modelo de la subunidad  $\alpha_{i/o}$  fue alineado con la cristalografía de la subunidad  $\alpha_{i/o}$  (PDB: 6G79), posteriormente se eliminaron las cadenas del receptor 5HT1A y de la subunidad  $\alpha_{i/o}$  y se unieron las estructuras para formar el complejo CXCR3-GP. El complejo se preparó en CHARMM-GUI bajo las condiciones mencionadas en la sección 6.3 y se realizó una simulación AA-MD de 100 ns para relajar el sistema.

#### **6.4.1.3. Construcción de los Complejos CXCR3/Quimiocinas**

Para construir los complejos CXCR3 con sus respectivas quimiocinas, se realizó un acoplamiento molecular proteína-proteína en el servidor web ClusPro [141,142], se utilizó la conformación representativa del clúster más numeroso (C1) de la dinámica de 100 ns del complejo CXCR3-GP, el C1 de CXCL9 AA-MD y las estructuras presentes en los PDBs de CXCL10 y CXCL11. En el servidor ClusPro se consideró como restricción la proximidad a los primeros 16 a.a., así como, Y27 y Y29 para CXCR3 (ver Tabla 3) y para las quimiocinas no se definió ninguna restricción [143]. Obtenidos los complejos CXCR3-GP-quimiocinas, se realizó una simulación CG-MD de 1  $\mu$ s para cada complejo. Por último, se realizó una simulación AA-MD de 250 ns para el cluster1 de la dinámica CG-MD de CXCR3-GP-CXCL10, adicionando GTP y  $Mg^{2+}$  en la subunidad  $\alpha_{i/o}$  de la GP. 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 de cada complejo. Estas estructuras fueron convertidos a una topología *all-atom* en el módulo "All-Atom Converter" de "Martini Maker" en CHARMM-GUI utilizando la estructura inicial (F0) como control.

#### **6.4.1.4. Modelo general de interacciones proteína-ligando para CXCR3**

Las estructuras tridimensionales de los 894 ligandos reportados como antagonistas de CXCR3 [59–68] fueron obtenidas de la base de datos publica ZINC [69], con un valor de pKi dentro del rango de 5 a 9.7. Un *grid* de 40  $\times$  32  $\times$  40 puntos con un espaciado de 0.375 Å, centrado en los residuos relevantes para la activación del receptor, fue calculado con AutoGrid 4.2.6 [115]. Posteriormente, se realizó un acoplamiento molecular con AutoDock 4.2.6 optimizado para GPU, usando un total de

25 corridas y 25,000,000 evaluaciones, con un algoritmo genético Lamarckiano y el método Solis-Wets de búsqueda local [144] utilizando la conformación la estructura inicial (F0) del complejo CXCR3-CXCL10 obtenido de la simulación CG-MD. El programa Pharmer (2015, Pittsburg, PA, USA) [145] fue usado para identificar los elementos farmacofóricos de los ligandos acoplados en la conformación de unión más frecuente, obtenido del agrupamiento (*clustering*) de los resultados del acoplamiento de cada ligando utilizando un RMSD (*root-mean standard deviation*) límite (*cut-off*) de 2 Å en los complejos proteína-ligando: aceptores de puentes de hidrógeno (HAc), donadores de puentes de hidrógeno (HDn), anillos aromáticos (Arm), grupos hidrofóbicos (Hph), grupos con carga positiva (PIn) y grupos con carga negativa (NIn) en las conformaciones tridimensionales de los ligandos acoplados. Estas características fueron agrupadas de acuerdo a su naturaleza, posición y tamaño utilizando un método de estadístico de partición alrededor de medoides (*partition-around-medoids*, PAM) [146], implementado en el paquete de clúster [147], disponible en el programa estadístico R (3.5.2, Vienna, Austria) [148].

#### 6.4.2. Activación de CXCR6

##### 6.4.2.1. Relajación de los Modelos por Homología

Para el caso de CXCR6, el NH<sub>2</sub>-T fue reorientado de manera manual ya que estaba orientado hacia los ECLs y TMs, y la nueva estructura se sometió a los procesos de minimización y equilibrio mencionados en la sección 6.3. El modelo por homología de CXCL16s se sometió a una simulación AA-MD de 5 ns bajo los parámetros mencionados en la sección 6.3

##### 6.4.2.2. Construcción del Complejo CXCR6-CXCL16s

Utilizando la estructura minimizada de CXCR6 y el cluster1 de CXCL16s se realizó un *docking* proteína-proteína en el servidor ClusPro, usando como restricción los primeros 26 a.a. de CXCR6, para CXCL16s no se consideraron restricciones. Por último, se realizaron 5 simulaciones CG-MD de 1 µs, bajo los parámetros establecidos en la sección 6.3. Se obtuvieron las estructuras cada 100 ns de cada simulación y fueron convertidos a una topología *all-atom* en el módulo "All-Atom Converter" de "Martini Maker". Utilizando la opción "Average Structure" del módulo "Structure Analysis" de la versión académica de Schrödinger Maestro, el cual calcula una estructura representativa de un conjunto considerando un método de ponderación uniforme, superponiendo de las estructuras considerando los átomos pesados para el cálculo de RMSD y revisando simetría por comparación de RMSD, se seleccionaron las estructuras representativas de cada tiempo de simulación (*time frame* o simplemente *frame*) de las 5 simulaciones [139]. Las estructuras representativas se utilizaron para los análisis de rotación de ángulos e interacciones polares entre los segmentos transmembranales, considerando F0 como control. El cálculo de distancia entre el centro de masa, RMSD y RMSF (*root-mean standard fluctuation*) se calculó utilizando el promedio de los datos obtenidos en cada simulación.

#### 6.4.2.3. Modelo general de interacciones proteína-ligando para CXCR6 y Modelo de relación estructura-actividad 3D

Las estructuras de los 82 antagonistas reportados para CXCR6 con valores de IC<sub>50</sub> entre 0.04-50  $\mu$ M [36], fueron modelados en el programa Schrödinger Maestro [137,138]. Un primer acoplamiento molecular se realizó para localizar el sitio de unión de los antagonistas con un *grid* de 110  $\times$  100  $\times$  255 puntos y un espaciado de 0.375 Å, calculado con AutoGrid 4.2.6 [115], en la estructura del *frame* inicial (F0) de la simulación CXCR6 CG-MD. El acoplamiento molecular se realizó utilizando 50 corridas y 25,000,000 millones de evaluaciones en AutoDock 4.2.6 optimizado para GPU, con un algoritmo genético Lamarckiano y el método Solis-Wets de búsqueda local [144]. Utilizando el sitio de unión del ligando con mejor IC<sub>50</sub>, un nuevo *grid* fue calculado, 80  $\times$  80  $\times$  80 puntos con un espaciado de 0.375 Å. Un segundo acoplamiento molecular fue realizado bajo las mismas condiciones que el primero, en el nuevo *grid* calculado. La identificación de los elementos farmacofóricos fue realizada bajo los parámetros establecidos para CXCR3.

Las conformaciones obtenidas del segundo acoplamiento molecular se usaron como alineamiento para calcular el modelo 3D-QSAR usando OPEN3DQSAR [149], los campos estéricos y electrostáticos fueron calculados como campos moleculares tipo CoMFA [150], utilizando el valor de pIC<sub>50</sub> como variable dependiente. El método para evaluar el modelo QSAR fue *leave-one-out* (LOO) [151] usando el 28 % de los compuestos como grupo de prueba de los modelos.

#### 6.4.3. Estudio de la interacción de activadores alostéricos para TYR

##### 6.4.3.1. Construcción de la biblioteca de ligandos.

Mediante una búsqueda bibliográfica se construyó una biblioteca de 28 ligandos alostéricos de TYR, tomando en cuenta que las moléculas fueran evaluadas en líneas celulares de melanocitos humanos y que se reportarán como activadores no competitivos o alostéricos [152,153]. Las moléculas en su mayoría son derivados de chalconas y se incluyó al 8-metoxipsoraleno (8-MOP) el cual es un fármaco utilizado en la terapéutica del vitíligo y es activador de la TYR.

##### 6.4.3.2. Conformación activa e inactiva de TYR

Utilizando el clúster de TYR-Zn<sup>2+</sup>, los átomos de Zn<sup>2+</sup> fueron reemplazados por átomos de Cu<sup>2+</sup> y se adicionaron las moléculas de agua y de oxígeno con estos iones para simular la estructura activa e inactiva de la TYR, respectivamente. Se realizaron simulaciones AA-MD de 100 ns en el programa Desmond de Schrödinger Maestro [137,138].

##### 6.4.3.3. Modelo general de interacciones proteína-ligando para TYR

Las estructuras de los 28 ligandos reportados fueron modeladas en el programa Schrödinger Maestro. Un *grid* de 126  $\times$  126  $\times$  126 puntos con un espaciado de 0.375 Å fue calculado con el programa AutoGrid 4.2.6 [115], utilizando la conformación del clúster más representativo de la simulación AA-MD de TYR-Cu<sup>2+</sup>. Posteriormente, se realizó un acoplamiento molecular con

AutoDock 4.2.6 optimizado para GPU, usando un total de 25 corridas y 25,000,000 evaluaciones, con un algoritmo genético Lamarckiano y el método Solis-Wets de búsqueda local [144]. La identificación de los elementos farmacofóricos fue realizada bajo los parámetros establecidos para CXCR3.

#### *6.4.3.4. Manipulación de los Complejos y Construcción de Figuras*

Todas las gráficas se construyeron en el programa R [148] utilizando las librerías de ggplot2 [154]. Los alineamientos de los complejos y todas las figuras fueron realizadas en el programa PyMOL [155] y la manipulación de los complejos fue realizado en la versión académica del programa Schrödinger-Maestro [139].

Dirección General de Bibliotecas UNQ

## 7. Resultados y discusión

### 7.1. Modelos por homología

Para elección del mejor modelo, entre los 5 que construyó I-TASSER para cada proteína, se consideró el *C-score* (-5 a 2, valores altos indican que el modelo es confiable) y el *TM-score* (valores mayores a 0.5 son indicativos de una correcta topología del modelo). Todos los modelos fueron evaluados en el servidor web Molprobitry para obtener los diagramas de Ramachandran (*Ramachandran Plot*, RP), a mayor porcentaje de residuos en áreas favorecidas existe una mejor calidad estereoquímica de los modelos [156]. La Tabla 4 resume los valores de *C-score*, *TM-score* y los residuos favorecidos en el RP de todos los modelos (los diagramas de Ramachandran se encuentran en el Anexo I).

**Tabla 4.** Calidad de los modelos por homología.

ID	C-score	TM-score	Favorecidos Ramachandran
CXCR3-M1	-0.65	0.63 ± 0.14	85.52 %
CXCL9-M1	-1.11	0.58 ± 0.14	72.25 %
G $\alpha_{i/o}$ -M1	1.00	0.85 ± 0.08	91.19 %
CXCR6-M1	-0.46	0.65 ± 0.13	85.29 %
CXCL16s-M1	-1.51	0.53 ± 0.15	67.57 %
TYR-Cito	-0.95	0.59 ± 0.14	83.33 %
TYR-TM	-1.82	0.49 ± 0.15	75.51 %
TYR-Mel	-1.69	0.51 ± 0.15	75.64 %
TYR-M1	-	-	81.34 %

M1: modelo 1, TYR-cito: modelo de tirosinasa región citosólica, TYR-TM: Modelo de tirosinasa región transmembranal, TYR-Mel: modelo tirosinasa región melanosomal.

El modelo completo de TYR se construyó uniendo manualmente los modelos de TYR-Cito, TYR-TM y TYR-Mel en Schrödinger Maestro [139]. Los modelos de CXCR3, CXCR6 y TYR presentan un buen porcentaje en los residuos favorecidos del RP, indicando que los modelos eran útiles para su estudio, aún sin una simulación para relajar la estructura. Sin embargo, los modelos de CXCL9 y CXCL16s presentan un porcentaje de residuos favorecidos bajo, por lo cual era necesario que se sometieran a una simulación de dinámica molecular para relajar la estructura.

### 7.2. Estudio computacional de la activación del receptor a quimiocina CXCR3

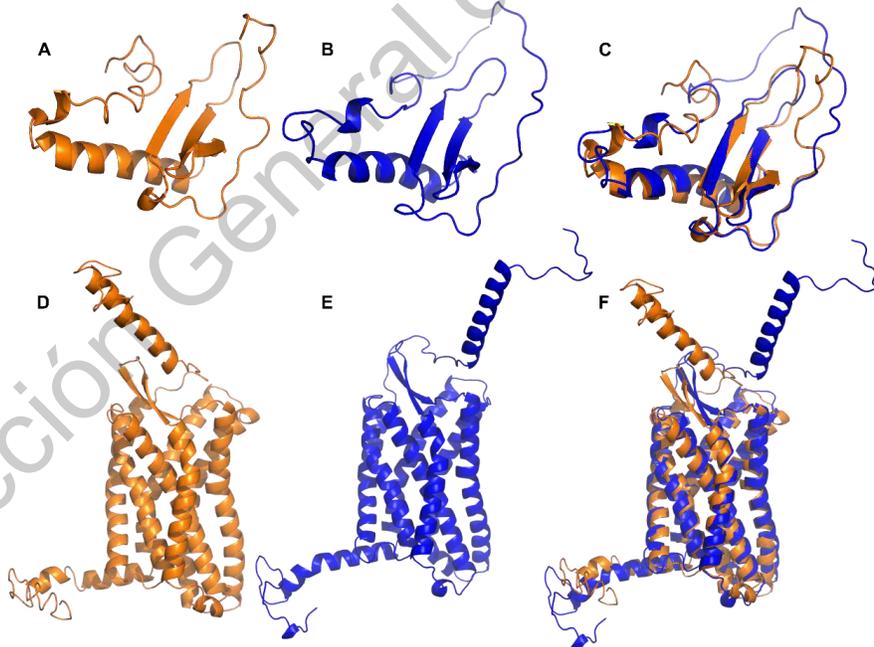
#### 7.2.1. Activación de CXCR3

Una vez obtenidos los modelos por homología de CXCR3, CXCL9 y la subunidad  $\alpha_{i/o}$ , se realizaron simulaciones de dinámica molecular para relajar los modelos y estudiar el proceso de activación del receptor por estímulo de sus ligandos naturales, las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11.

### 7.2.1.1. Relajación de los modelos por homología de CXCR3 y CXCL9

Los modelos por homología de CXCR3 y CXCL9 se relajaron mediante una simulación AA-MD de 50 y 5 ns, respectivamente, y se adicionaron las modificaciones postraduccionales de cada proteína. En el caso de CXCR3, CHARMM-GUI no cuenta con los parámetros de residuos con sulfataciones, por lo cual se optó por utilizar fosforilaciones para sustituir las sulfataciones ya que el ambiente químico generado ambas modificaciones postraduccionales es similar. Las estructuras más representativas de cada simulación (C1) se evaluaron en Molprobitry para obtener los residuos favorecidos en el RP y se alinearon con los respectivos modelos para observar el cambio entre la estructura inicial y la estructura representativa del clúster más numeroso durante cada simulación (Figura 7).

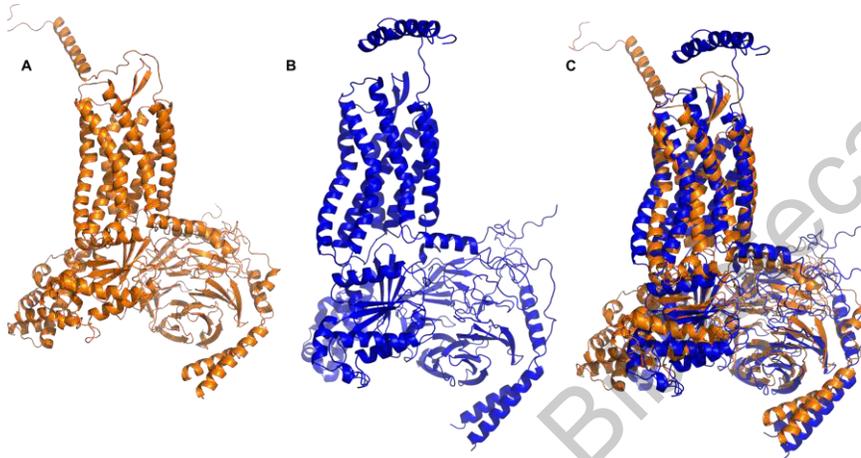
Tomando como medida de corte un valor de RMSD  $\geq 2$  Å para definir si existe una diferencia significativa entre dos estructuras [157], el alineamiento entre CXCL9-M1 y CXCL9-C1 presentó un RMSD de 2.675 Å y los residuos favorecidos en el RP aumentó a 89.11 %, esto indica que la conformación obtenida después de la simulación AA-MD es útil para los estudios posteriores. Por otro lado, el alineamiento entre CXCR3-M1 y CXCR3-C1 un RMSD de 3.234 Å, el porcentaje de los residuos favorecidos en el RP aumentó a 90.44 %. Estos resultados indican que ambos modelos evolucionaron hacia una conformación energéticamente más favorable durante la simulación AA-MD útil para los estudios posteriores de AA y CG-MD.



**Figura 7.** Estructuras de CXCL9 y CXCR3. A) CXCL9-M1, B) CXCL9-C1, C) Alineamiento entre CXCL9-M1 y CXCL9-C1, D) CXCR3-M1, E) CXCR3-C1 y F) Alineamiento entre CXCR3-M1 y CXCR3-C1.

### 7.2.1.2. Construcción del complejo CXCR3-GP y relajación por AA-MD

El C1 de la simulación AA-MD 50 ns de CXCR3 fue utilizado para acoplar la GP utilizando el modelo de la subunidad  $\alpha_{i/o}$  y las estructuras del complejo  $\beta\gamma$  presentes en el PDB 6G79. Mediante un proceso de alineamiento entre el C1 de AA-MD 50 ns y el receptor 5HT1A. Una vez obtenido el complejo CXCR3-GP, se realizó una simulación AA-MD de 100 ns para relajar el complejo. El alineamiento entre el complejo CXCR3-GP y la conformación de CXCR3-GP-C1 presentó un RMSD de 5.834 Å (Figura 8).



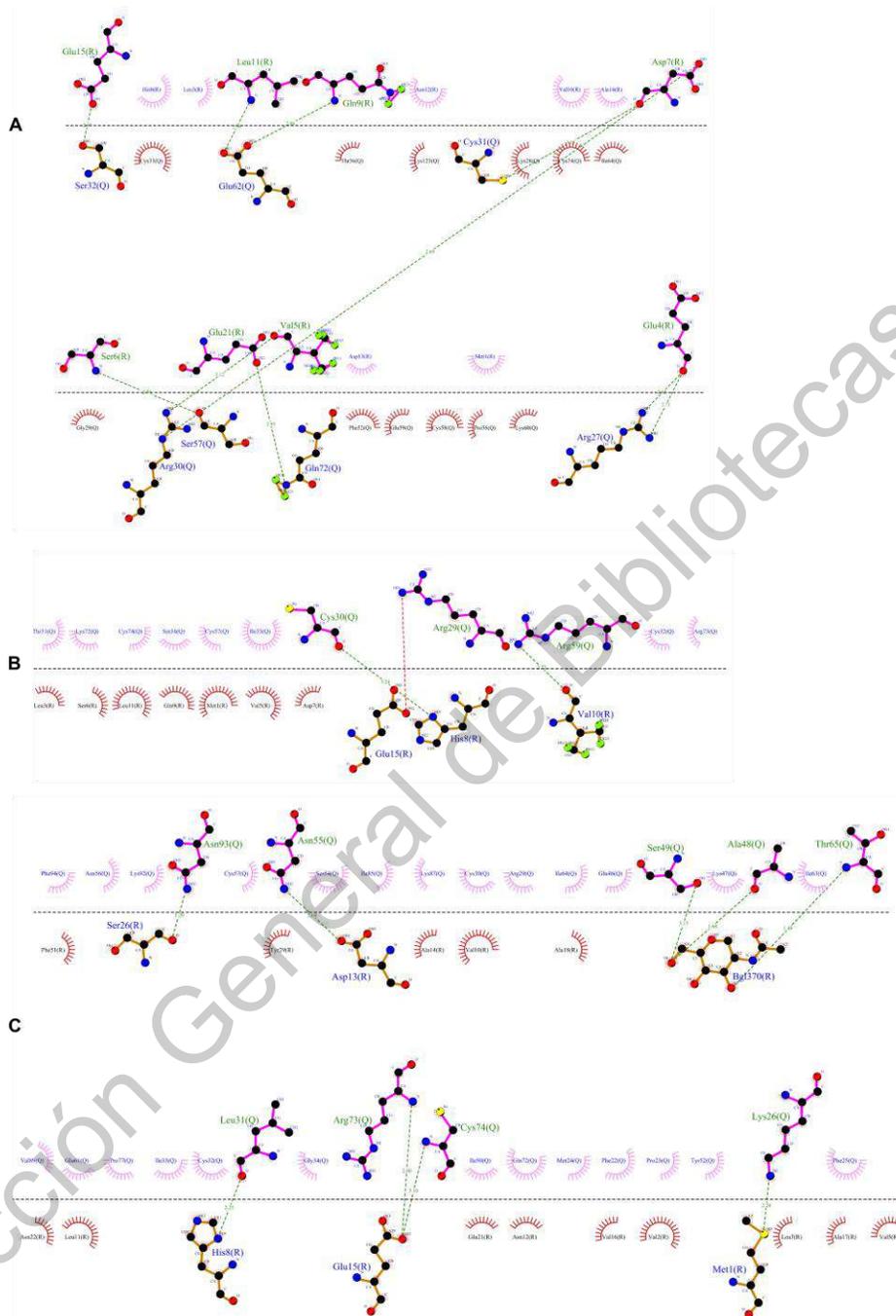
**Figura 8.** Estructura de CXCR3-GP y CXCR3-GP C1. A) CXCR3-GP, B) CXCR3-GP C1, C) Alineamiento entre CXCR3-GP y CXCR3-GP C1.

### 7.2.1.3. Construcción de los complejos CXCR3/Quimiocinas y simulaciones CG-MD

La estructura de CXCR3 obtenida en el C1 de la simulación de 100 ns fue utilizado para construir los complejos CXCR3/quimiocinas mediante el servidor público ClusPro, utilizando como restricción la proximidad a los primeros 16 a.a. y a los residuos Y27 y Y29. La estructura seleccionada para la construcción del sistema para CG-MD fue basada en el clúster más numeroso del acoplamiento combinando las interacciones hidrofóbicas y electroestáticas. Las interacciones entre las tres quimiocinas y CXCR3 obtenidas en el acoplamiento molecular se presentan en la Figura 9.

Mayoritariamente existen interacciones de tipo puente de hidrógeno entre residuos básicos de las quimiocinas y residuos ácidos de CXCR3. Las interacciones polares entre CXCR3 y CXCL9 se limitan a puentes de hidrógeno, no hay presencia de interacciones con las glicosilaciones o las fosforilaciones en el receptor. Para el caso de CXCR3-CXCL10 existe una interacción de tipo puente salino entre los residuos E15 y R29 y las interacciones hidrofóbicas tienen mayor relevancia en la interacción entre CXCR3 y CXCL10. En el caso del complejo CXCR3-CXCL11 existen interacciones con las glicosilaciones presentes en el receptor, esto puede indicar que existe una relevancia de estas modificaciones postraduccionales para una unión temprana de CXCL11 con CXCR3. Los acoplamientos respetaron las restricciones propuestas en el servidor y permitieron observar las interacciones iniciales y posicionar las quimiocinas para los procesos de simulación CG-MD.

Los tiempos de simulación (*frames*) de las estructuras representativas en las diferentes simulaciones AA-MD se presentan en la tabla 5.



**Figura 9.** Interacciones entre CXCR3 y CXCL9, CXCL10 y CXCL11. A) CXCR3-CXCL9, B) CXCR3-CXCL10 y C) CXCR3-CXCL11. CXCR3 es representada por la letra R y las diferentes quimiocinas por la letra Q. Los puentes de hidrógeno están representados por líneas punteadas verdes, los puentes salinos por líneas punteadas rojas y las interacciones hidrofóbicas se representan con los residuos en color rojo y lila.

**Table 5.** *Frames y clustering* de las simulaciones AA-MD.

Complejo	Tiempo de simulación de la conformación más representativa (ns)			Cut-off (nm)	Clústeres
	5 ns	50 ns	100 ns		
CXCR3	-	32.1	86.9	0.4 */0.2 **	3 */10 **
CXCL9	3.8	-	-	0.2	14

#### 7.2.1.4. Simulaciones 1 $\mu$ s CG-MD de los complejos CXCR3/quimiocinas.

Una vez obtenidos los complejos CXCR3/quimiocinas de ClusPro, se construyeron los sistemas para una simulación de 1  $\mu$ s de tipo CG-MD. Con el objetivo de observar la evolución del complejo y comprobar los dos pasos de activación del receptor CXCR3. Tomando en cuenta la teoría de activación de dos pasos donde la quimiocina interactúa con el NH<sub>2</sub>-T del receptor y el posterior movimiento hacia los segmentos transmembranales para causar un cambio conformacional en el receptor, se realizó un análisis comparando las conformaciones cada 100 ns, usando el *frame0* (F0) como estructura control, esta conformación se obtuvo después de los procesos de minimización y equilibrio del sistema, previo al paso de producción. Analizando las interacciones polares entre las quimiocinas y el receptor, las interacciones polares entre los segmentos transmembranales, las interacciones del segmento DRF, la rotación de los segmentos transmembranales y la distancia entre la quimiocina y el receptor. Considerando que los parámetros para moléculas pequeñas no están presentes en el módulo Martini Maker del servidor CHARMM-GUI, las modificaciones postraduccionales de CXCR3 (glicosilaciones y fosforilaciones) y las quimiocinas no se tomaron en cuenta, solo se mantuvieron los puentes disulfuro. La Tabla 6 presenta los *frames* de los clústeres de cada complejo.

**Table 6.** Tiempo de simulación y *clustering* de las simulaciones CG-MD.

Complejos	Tiempo de simulación de la estructura más representativa (ns)			Cutoff (nm)	Clústeres
	Clúster 1	Clúster2	Clúster3		
CXCR3-CXCL9	607.0	131.0	39.0	0.6	10
CXCR3-CXCL10	787.9	159.6	51.2	0.6	10
CXCR3-CXCL11	532.7	171.3	979.3	0.6	10

Las estructuras representativas de los complejos se encuentran alrededor de los 500-800 ns, indicando que es necesario simulaciones de dinámica molecular *all-atom* más largas para poder observar la evolución del sistema con mayor detalle.

#### *Cambios conformacionales en CXCR3 CG-MD.*

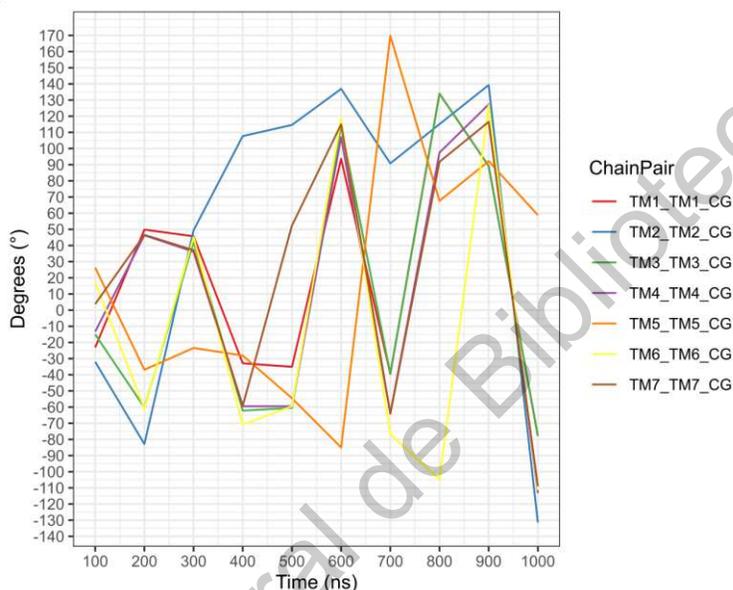
Utilizando la estructura del complejo CXCR3-GP, se realizó una simulación de 1  $\mu$ s para comparar los cambios derivados de la presencia de las diferentes quimiocinas. Los aminoácidos que pertenecen a los TMs de CXCR3 fueron obtenidos de UniProt y se presentan en la tabla 7 [158]. Las interacciones polares entre los TMs se presentan en el Anexo II.

**Table 7.** Segmentos transmembranales de CXCR3

TM1	TM2	TM3 *	TM4	TM5 *	TM6	TM7
54-80	90-110	126-147	170-189	213-233	256-277	299-321

- Algunos residuos extras fueron incluidos en el análisis; en TM3, los residuos 148–150 pertenecen a la secuencia DRY y los residuos 234-235 se han reportado como relevantes en la rotación de TM5.

Se analizaron los cambios en los ángulos de rotación e interacciones de los segmentos transmembranales. Los TMs se mantienen en constante movimiento durante la simulación (Figura10).



**Figura 10.** Rotación de los segmentos transmembranales de CXCR3-GP.

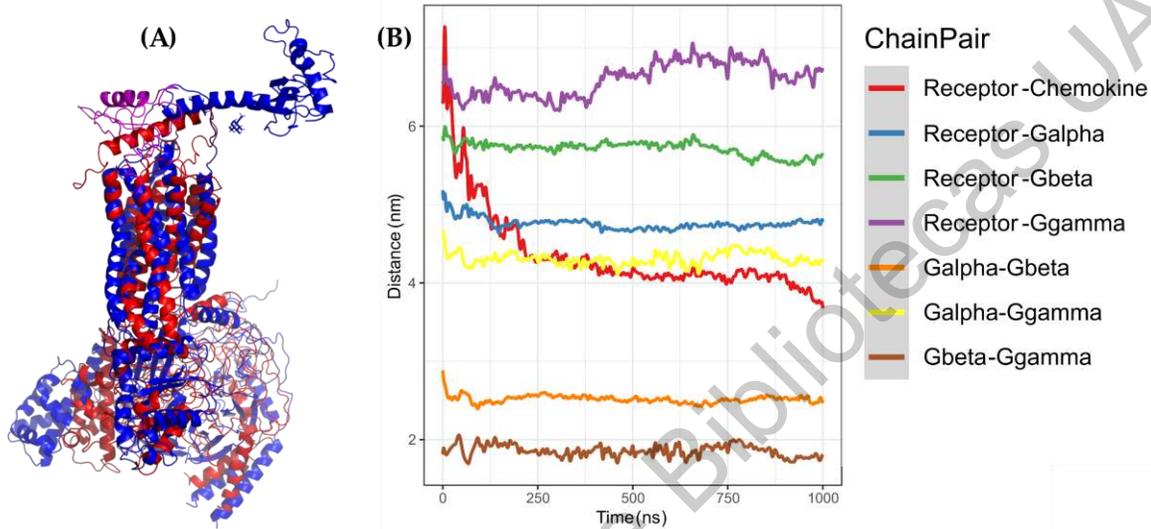
Adicionalmente, existen interacciones constantes entre TM3, TM4, TM5, TM6 con TM7; A127-S304, L130-Y308, N134-T308 (TM3-TM7), D186-K300 (TM4-TM7), Q219-K300 (TM5-TM7) y Y271-K300 (TM6-TM7), estas interacciones pueden indicar que el TM7 actúa como un eje central en el estado inactivo del receptor interactuado con los segmentos TM3, TM4, TM5 y TM6.

#### 7.2.1.5. Complejo CXCR3-CXCL9

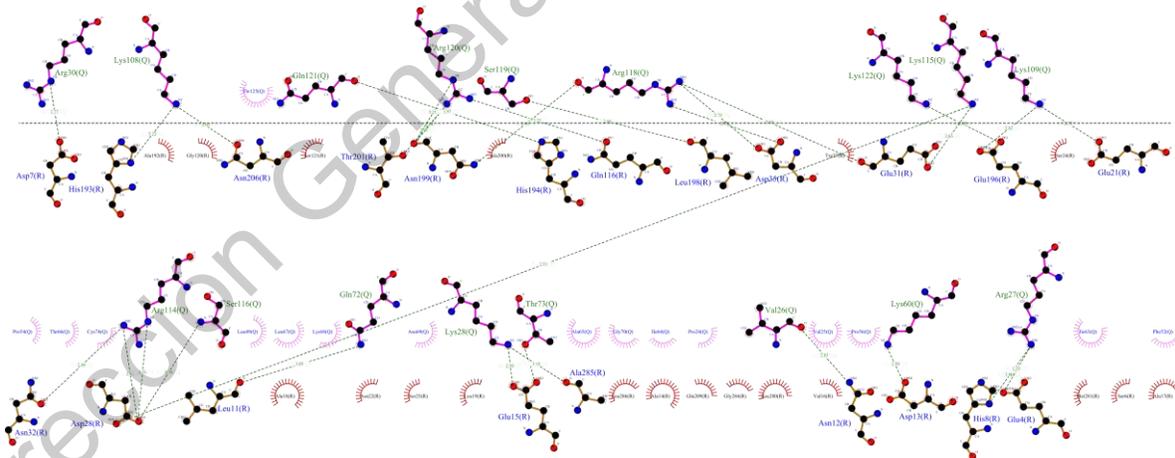
En la simulación CG-MD fue posible observar los dos pasos de activación del receptor CXCR3, observando en primera instancia, la llegada de la quimiocina y el posterior movimiento hacia los segmentos transmembranales para promover los cambios conformacionales. La distancia mínima entre CXCL9 y CXCR3 se observa al final de la simulación; sin embargo, existe un equilibrio a partir de los 250 ns. Por otro lado, la distancia entre el receptor y la GP no sufrió cambios representativos, este comportamiento es explicado debido a la falta de GTP en el sistema, debido a las limitantes del módulo Martini Maker (Figura 11).

Las interacciones entre CXCR3 y CXCL9 en el cluster1 de la simulación aumentan considerablemente con respecto a la estructura inicial obtenida por *docking* proteína-proteína (Figura

12). Aunque los residuos de CXCR3 involucrados en la interacción con CXCL9 no coinciden directamente con los residuos reportados como relevantes, estos residuos se posicionan cercanos a los residuos de interacción, los residuos N22 y Y27 forman interacciones hidrofóbicas, estos residuos son relevantes ya que presentan modificaciones postraduccionales (glicosilación y sulfatación, respectivamente).



**Figura 11.** Simulación CG-MD CXCR3-CXCL9. A) Alineamiento entre F0 (azul) y el cluster1 de la simulación (rojo), presenta un RMSD de 9.409 Å. B) Distancia entre las cadenas del complejo CXCR3-CXCL9. La distancia entre la quimiocina y el receptor disminuye durante la simulación.



**Figura 12.** Interacciones entre CXCR3-CXCL9 cluster1. Existe un incremento en los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

Ante estos resultados, no es posible descartar que estas interacciones tengan influencia en la interacción con CXCL9. Para comprobar el cambio conformacional de CXCR3 inducido por la presencia de CXCL9 se realizó un análisis de rotación e interacciones de los segmentos transmembranales y la presencia del *arginine cage*, así como las interacciones con la quimiocina

cada 100 ns (Anexo II) usando la conformación a 0 ns (F0) como referencia. La presencia de la interacción iónica entre D148-R149 (*arginine cage*) está relacionada con la activación de GPCRs y estuvo presente en diferentes conformaciones de la simulación CG-MD del complejo CXCR3-CXCL9. En la Tabla 8 se observan la presencia de esta interacción durante las simulaciones de CXCR3/quimiocinas. Esta interacción se presenta de 0-500 ns, se pierde a los 600 ns, se recupera a los 700, vuelve a perderse entre 800-900 y se recupera al final de la simulación del complejo CXCR3-CXCL9.

**Table 8.** Presencia del *arginine cage* en las simulaciones CG-MD.

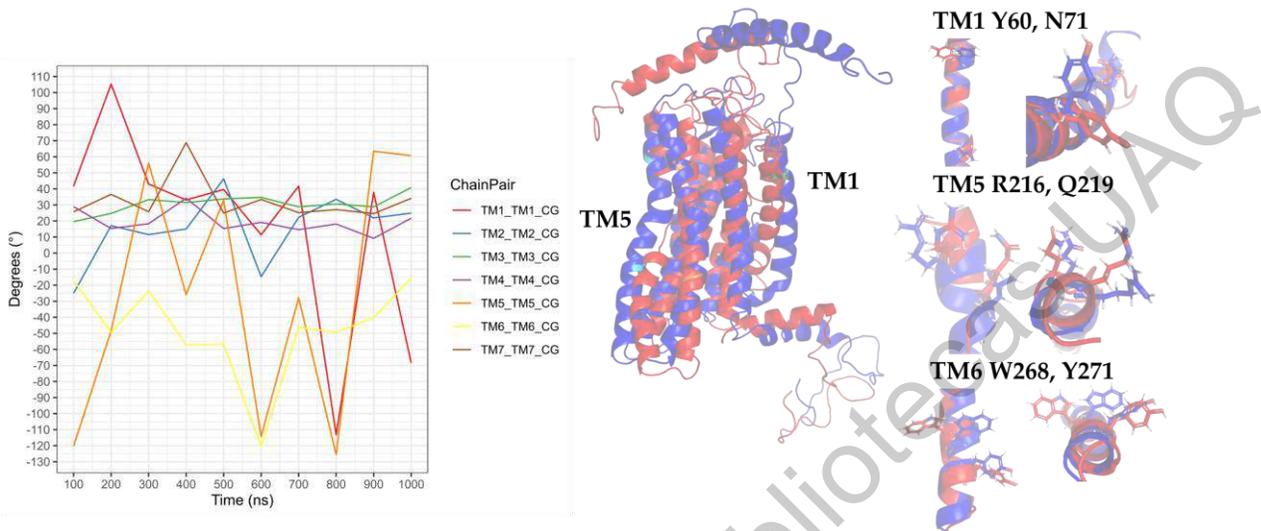
Time Frame (ns)	CXCR3-CXCL9	CXCR3-CXCL10	CXCR3-CXCL11
0	X	X	X
100	X	-	X
200	X	-	X
300	X	-	X
400	X	-	-
500	X	-	-
600	-	-	-
700	X	X	-
800	-	-	X
900	-	-	-
1000	X	-	-

#### *Cambios conformacionales en los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL9*

La rotación de los segmentos transmembranales es relevante para la activación de los GPCRs, mientras que la red de puentes de hidrógeno entre los TMs cambia en presencia de agonistas y antagonistas [54,56,57]. En la simulación CG-MD de CXCR3-CXCL9, se observaron cambios en los ángulos de rotación de los TMs. TM2, TM3, TM4 y TM7 se mantuvieron con una ligera rotación a lo largo de la simulación. Por otro lado, TM1, TM5 y TM6 presentan cambios drásticos en la rotación entre los 600-1000 ns. La rotación de TM5 y TM6 a 600 y 700 ns coincide con la pérdida y regeneración del *arginine cage* (Figura 13).

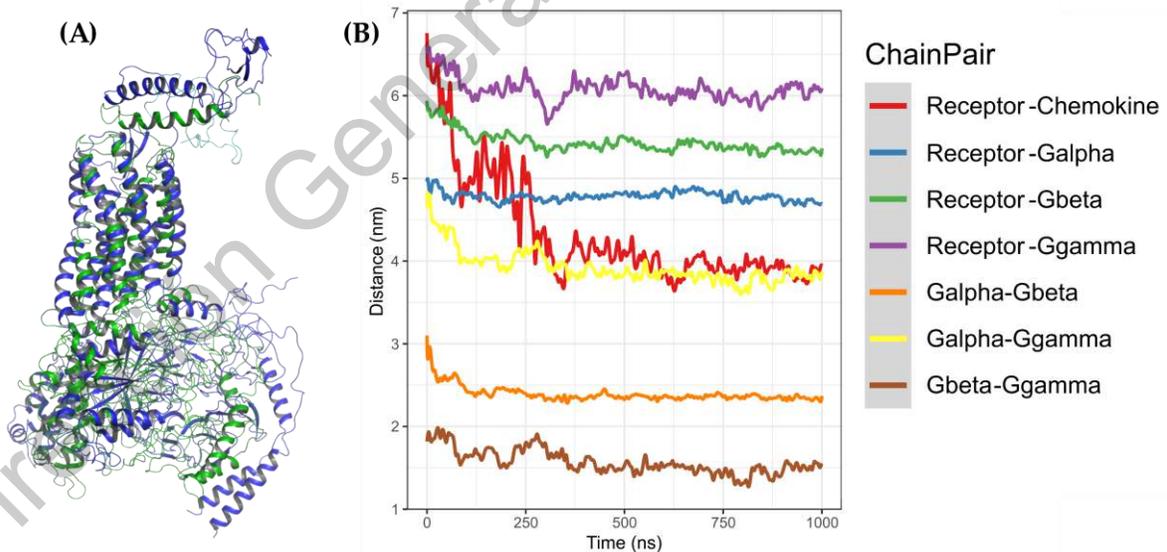
Los segmentos TM1, TM5 y TM6 presentan rotaciones intensas a partir de los 600 ns, coincidiendo con la ruptura del *arginine cage*; sin embargo, a 700 y 1000 ns, estos TMs vuelven a rotar coincidiendo con la regeneración de esta interacción. Las interacciones polares entre CXCR3 y CXCL9 aumentan conforme la simulación avanza, siendo lisinas los residuos que más frecuentemente interactúan, lo que concuerda con reportes experimentales donde mencionan la relevancia de los residuos cargados positivamente en la quimiocina. Adicionalmente, las interacciones polares entre los segmentos transmembranales de CXCR3-CXCL9 (Anexo II) mostraron un comportamiento interesante, ya que el residuo R216 en TM5 se ha reportado como un residuo relevante para la actividad de CXCR3 [51]; en la simulación, R216 se mantiene en constante interacción con N132 en TM3 y D186 en TM4. La red de interacciones entre N132-D186-R216-Q219 parece ser relevante para la conformación funcional de CXCR3 en complejo con CXCL9. En

comparación con CXCR3-GP, la rotación de los TMs es menor, lo que podría indicar que la presencia de la quimiocina estabiliza el estado meta-activo de CXCR3 con estímulo de CXCL9. Estos resultados confirman los dos pasos de activación de CXCR3 en presencia de CXCL9.



**Figura 13.** Rotación de los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL9 CG-MD. En azul se presenta la conformación F0 y en rojo la conformación a 800 ns.

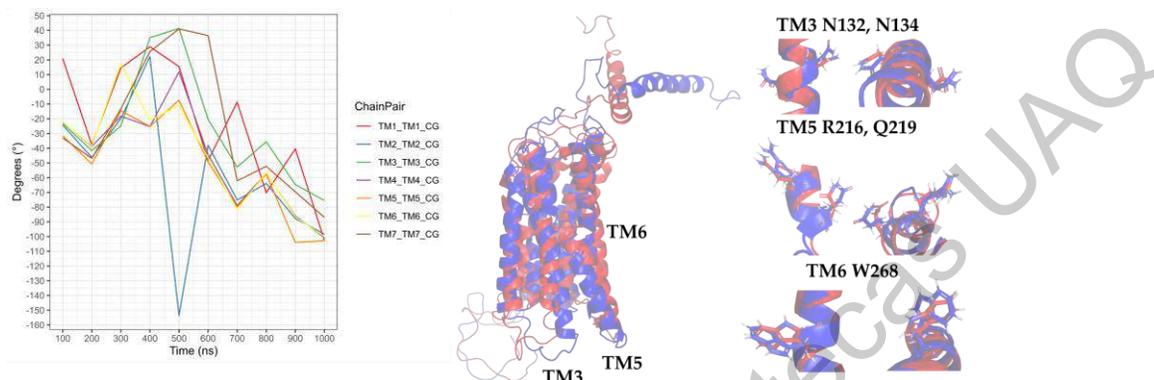
#### 7.2.1.6. Complejo CXCR3-CXCL10



**Figura 14.** Simulación CG-MD CXCR3-CXCL10. A) Alineamiento entre F0 (azul) y el cluster1 de la simulación (verde), presenta un RMSD de 9.409 Å. B) Distancia entre las cadenas del complejo CXCR3-CXCL10. La distancia entre la quimiocina y el receptor disminuye durante la simulación.



igual manera, las interacciones polares e hidrofóbicas entre CXCL10 y CXCR3 aumentan a partir de los 300 ns (Anexo II) y se presenta una interacción entre R197 en CXCR3 y A64 y E71 de CXCL10. R197 es reportado como un residuo relevante para la unión y actividad de CXCR3 por estímulo de CXCL10.



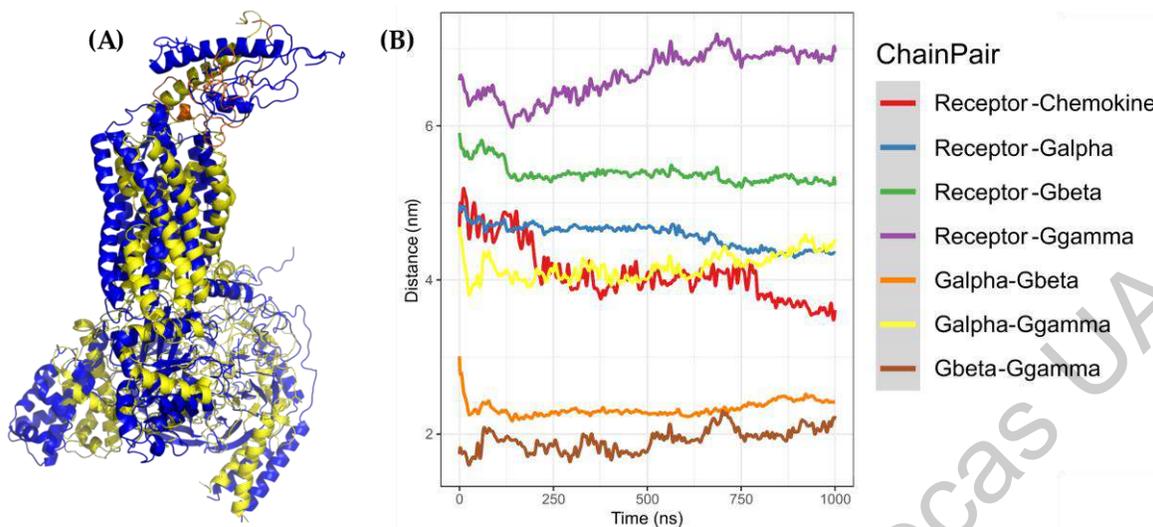
**Figura 16.** Rotación de los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL10 CG-MD. En azul se presenta la conformación F0 y en rojo la conformación a 700 ns.

Las interacciones entre los TMs con estímulo de CXCL10 son menos comparadas con el estímulo de CXCL9 (Anexo II), no se presenta interacción de R216 con TM3 ni TM4; sin embargo, las interacciones entre N132-Q219 y D186-Q219 se mantienen en todos los *frames* analizados. La interacción entre D186-Q219 se mantiene en toda la simulación, mientras que la interacción N132-Q219 ocurre de manera constante a partir de los 300 ns y se pierde a los 700 ns, coincidiendo con la regeneración del *arginine cage*. Esto sugiere que la interacción entre TM4-TM5 mediante D186-Q219 es necesaria para que se alcance una conformación estable de CXCR3 y puede actuar como un punto de estabilización entre los estados inactivo y meta-activo de CXCR3. Adicionalmente, TM2 interactúa de manera constante con TM3, TM4 y TM7 entre 300-700 ns, posteriormente las interacciones se pierden coincidiendo con la regeneración del *arginine cage*, por lo cual, TM2 es relevante para la estabilización de la conformación funcional del complejo CXCR3-CXCL10.

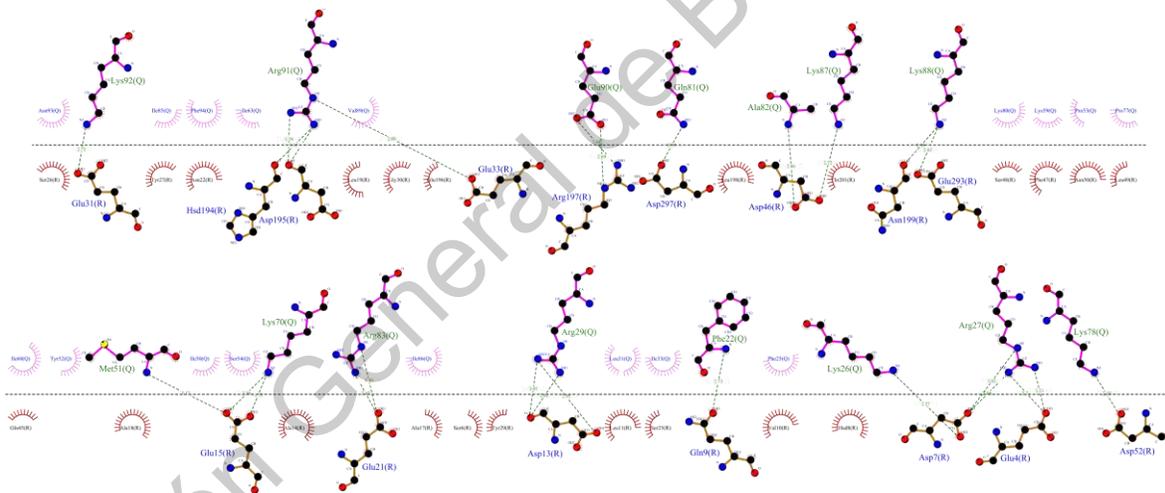
#### 7.2.1.7. Complejo CXCR3-CXCL11

El complejo CXCR3-CXCL11 presentó un comportamiento similar a los dos complejos anteriores, CXCL11 disminuye la distancia con respecto a CXCR3 orientándose hacia los TMs, alcanza un equilibrio a los 250 ns y se mantiene hasta los 750 donde disminuye un poco la distancia (Figura 17). El complejo GP se mantiene igual con una ligera separación de la subunidad  $\alpha$  con respecto al receptor; sin embargo, como en las simulaciones previas, el comportamiento de la GP es despreciable ya que al no tener presente el nucleótido no realiza la función esperada.

Las interacciones polares entre CXCL11 y CXCR3 en el cluster1 aumentaron con respecto al F0, se observaron interacciones entre R197 y E293 de CXCR3 con R90 y K88 en CXCL11, R197 y E293 se han reportado como residuos relevantes para la interacción y actividad de CXCL11 (Figura 18).



**Figura 17.** Simulación CG-MD CXCR3-CXCL11. A) Alineamiento entre F0 (azul) y el cluster1 de la simulación (amarillo), presenta un RMSD de 9.853 Å. B) Distancia entre las cadenas del complejo CXCR3-CXCL11. La distancia entre la quimiocina y el receptor disminuye durante la simulación.

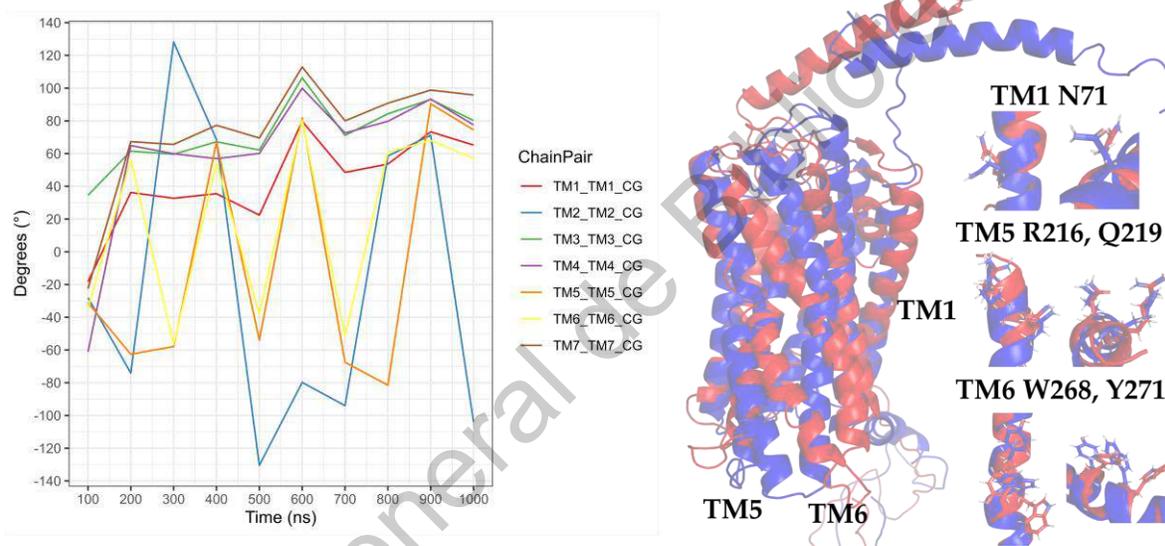


**Figura 18.** Interacciones entre CXCR3-CXCL10 cluster1. Existe un incremento en los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

Similar a lo ocurrido en los complejos con CXCL9 y CXCL10, las interacciones polares entre CXCL11 y CXCR3 aumentan a partir de los 200 ns (Anexo II), pero disminuyen antes y durante la regeneración del *arginine cage* (300, 400, 700 y 800 ns). A partir de los 100 ns se presentan interacciones de los residuos R197 y E293 de CXCR3 con residuos de CXCL11, la interacción de R197 se mantiene durante el resto de la simulación y la interacción de E293 se pierde a los 500 y 900 ns. Esto puede indicar que la presencia de esta interacción juega un papel importante en la interacción de E293 con CXCL11.

### Cambios conformacionales en los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL11

Los TMs de CXCR3 rotan con mayor intensidad con estímulo de CXCL11 en comparación a CXCL9 y CXCL10 (Figura 19). A 200 ns, los segmentos transmembranales (con excepción de TM3) rotan de manera intensa coincidiendo con la ruptura del *arginine cage*, TM3, TM4 y TM7 mantienen un comportamiento similar a lo largo de la simulación sin grandes cambios, pero presentan un pico relevante a 600 ns. En comparación, TM5 y TM6 muestran cambios drásticos a 200 ns, coincidiendo con la ruptura del *arginine cage* y a 400 y 800 ns donde coinciden con la regeneración de esta interacción. TM2 presenta cambios relevantes en su rotación a lo largo de la simulación, cambiando antes de la regeneración del *arginine cage* a 300 y 700 ns. TM1, TM5 y TM6 presentan un cambio de considerable magnitud en comparación a TM2, TM3, TM4 y TM7 a 600 ns.



**Figura 19.** Rotación de los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL11 CG-MD. En azul se presenta la conformación F0 y en rojo la conformación a 600 ns.

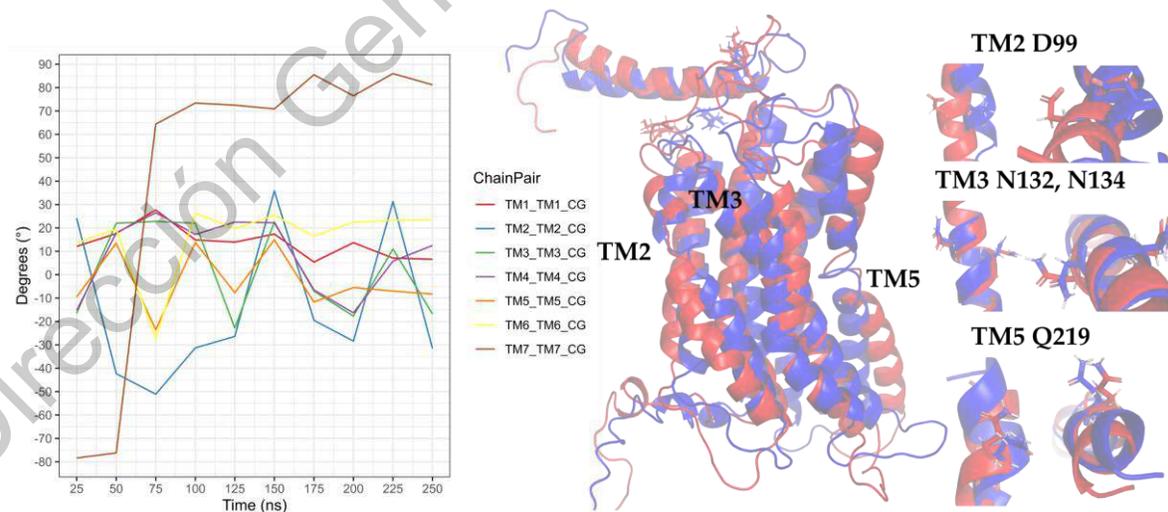
Las interacciones polares entre los TMs incrementan a partir de los 200 ns (Anexo II). La interacción entre N132-Q219 no se presenta en esta simulación; sin embargo, las interacciones entre TM3-TM6 a través de G138-W268 se observan a partir de los 200 ns, la interacción de TM4-TM5 mediante D186-Q219 se mantiene durante toda la simulación. TM2 presentó interacciones con TM3, TM4 y TM7 después de los 200 ns y se presentó una interacción entre el segmento DRY con Y233 en TM5 y C234 del loop intracelular 3 (Anexo II).

El segmento transmembranal 2 muestra ser relevante para los cambios conformacionales en CXCR3 por estímulo de CXCL10 y CXCL11, pero no para CXCL9. En presencia de CXCL9 R216 en TM5 se mantiene en constante interacción con N132 (TM3) y D186 (TM4). En contraste, con estímulo de CXCL10 y CXCL11 la interacción entre N132 y R216 no se observa, por lo que la red de interacciones de puente de hidrógeno entre TM3, TM4 y TM5 parece ser necesaria para la estabilización de la

conformación funcional de CXCR3, mediante N132-D186-R216-Q219 para el caso de CXCL9, y N132-D186-Q219 para el caso de CXCL10 y CXCL11. Las interacciones entre TM3 y TM6 por estímulo de CXCL11 se presentan mediante G1385-W268 coincidiendo con la ruptura del *arginine cage* y la rotación de los TMs. La red de interacciones entre TM3, TM4, TM5, TM6 y TM7 presente en la simulación de CXCR3-GP disminuye con estímulo de las quimiocinas, corroborando que TM7 actúa como punto central para el estado inactivo y las interacciones entre N132-D186-Q219 funcionan para estabilizar el estado meta-activo del receptor. Estos resultados refuerzan el hecho que CXCR3 sufre cambios conformacionales diferentes con cada quimiocina y comprueba el segundo paso de activación de CXCR3 por estímulo de CXCL9, CXCL10 y CXCL11.

#### 7.2.1.8. Separación del complejo $\beta\gamma$ de la subunidad $\alpha$ de la GP

La quimiocina CXCL10 es de gran relevancia en la patogénesis de vitiligo debido al incremento en la concentración detectada en suero y piel de pacientes con vitiligo activo. Debido a esto, se ha considerado a CXCL10 como un marcador importante para evaluar la progresión del vitiligo. Para observar la teoría de dos pasos donde el segundo paso de activación es la separación del complejo  $\beta\gamma$  de la subunidad  $\alpha$  en la GP, se realizó una simulación de 250 ns AA-MD, preservando los puentes disulfuros y las modificaciones postraduccionales presentes en CXCR3, utilizando el cluster1 de la simulación CG-MD (787.9 ns) como estructura de partida, el cual fue convertido a una topología *all-atom* en el módulo Martini Maker de CHARMM-GUI. Esta conformación es previa a la conformación meta-activa de CXCR3 ya que está presente la interacción D148-R149 del *arginine cage*, por lo que se le adicionó la proteína  $G_{i/o}$  en complejo con GTP y  $Mg^{+2}$ . Las conformaciones presentes cada 25 ns fueron evaluadas tomando como referencia la conformación a tiempo inicial (F0) obtenida después de los procesos de minimización y equilibrio del sistema.

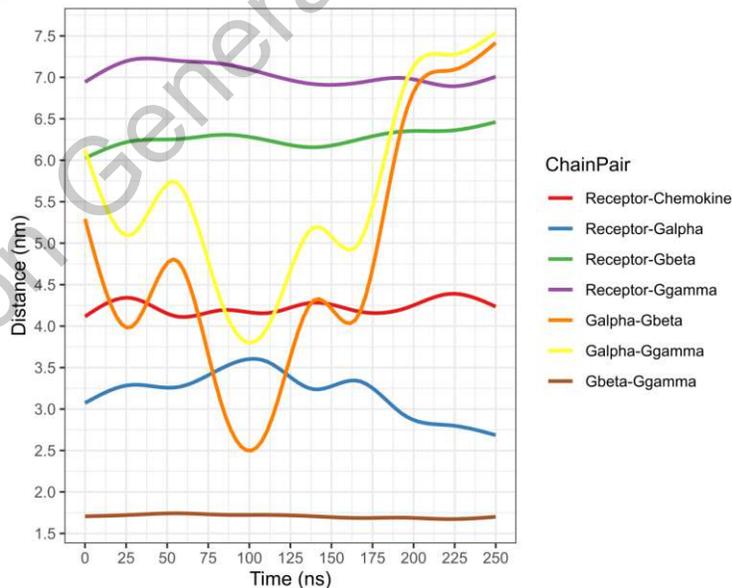


**Figura 20.** Rotación de los segmentos transmembranales del complejo CXCR3-CXCL10 AA-MD. En azul se presenta la conformación F0 y en rojo la conformación a 600 ns de la simulación CG-MD.

La rotación de TM5 y TM6 fue observada después de los 50 ns de simulación. Todos los TMs tienen un cambio en la rotación a los 175 ns, siendo TM2, TM3 y TM5 los que presentan mayor intensidad (Figura 20). TM7 tiene una rotación intensa a los 50 ns, después de eso se mantiene en un comportamiento con discretos cambios en la rotación, pero coincidiendo en el cambio de rotación con TM2, TM3 y TM5 a 175 ns. Comparando con la simulación CG-MD, los TMs tienen una rotación discreta, pero con un comportamiento similar para TM2, TM3, TM4, TM5 y TM6, confirmando que la rotación de TM2 es necesaria para la conformación activa del receptor.

Las interacciones polares entre CXCL10 y CXCR3 disminuyen al compararlas con el F0 (Anexo II); sin embargo, las interacciones hidrofóbicas incrementan conforme la simulación avanza. Las modificaciones postraduccionales parecen ser relevantes para la interacción de CXCL10 con CXCR3, ya que una interacción entre la glicosilación en N32 y K87 en CXCL10 se presenta a los 25 ns, adicionalmente, existen interacciones con la fosforilación en Y27 con K87 y K88 se presenta desde los 50 hasta los 175 ns de simulación.

Las interacciones entre los TMs cambian en presencia de una GP funcional, lo más relevante es la pérdida de la interacción de TM3-TM5 entre N132-Q219 (Anexo II), lo que indica que al momento que la GP se acopla esta interacción que funciona para estabilizar la conformación funcional se pierde para pasar a una conformación activa. La interacción entre TM3 y TM4 mediante N132 y D186 se mantiene en diferentes puntos de la simulación, al mismo tiempo, la interacción entre TM3 y TM6 se presenta mediante N134-W268. De 50 a 150 ns, existen interacciones entre TM5 y TM6 mediante R216 y Q219 con Y271. Estos cambios promueven la estabilización del complejo CXCR3-CXCL10-G<sub>i/o</sub> en los primeros 100 ns de simulación.



**Figura 21.** Distancia de las proteínas del complejo CXCR3-CXCL10-GP en la simulación AA-MD 250 ns.

Una vez estabilizado el complejo con la GP, se observa la separación del complejo  $\beta\gamma$  de la subunidad  $\alpha_{i/o}$  a partir de los 175 ns, coincidiendo con los cambios constantes en los ángulos de rotación de los TMs hasta el final de la simulación (Figura 21).

Adicionalmente la presencia de las interacciones N132-D186 y N134-W268 y la interacción de R149 con R193 (subunidad  $\alpha_{i/o}$ ) indican el estado activo del receptor. N132-D186 y N134-W268 estabilizan la conformación funcional del receptor y promueven la interacción de N149 con R193 de la subunidad  $\alpha_{i/o}$ , interacción necesaria para la activación de la GP. Estos resultados confirman que CXCR3 adquiere la conformación meta-activa cuando CXCL10 se orienta a los segmentos transmembranales y al momento que se acopla la GP, los cambios conformacionales en la subunidad  $\alpha_{i/o}$  promueven la separación del complejo  $\beta\gamma$ , estabilizando la conformación activa del receptor mediante N132-D186 y N134-W268, concordando con lo reportado experimentalmente que N132 es relevante para la actividad de CXCR3 [159].

### 7.2.2. Modelo general de interacciones proteína-ligando en CXCR3

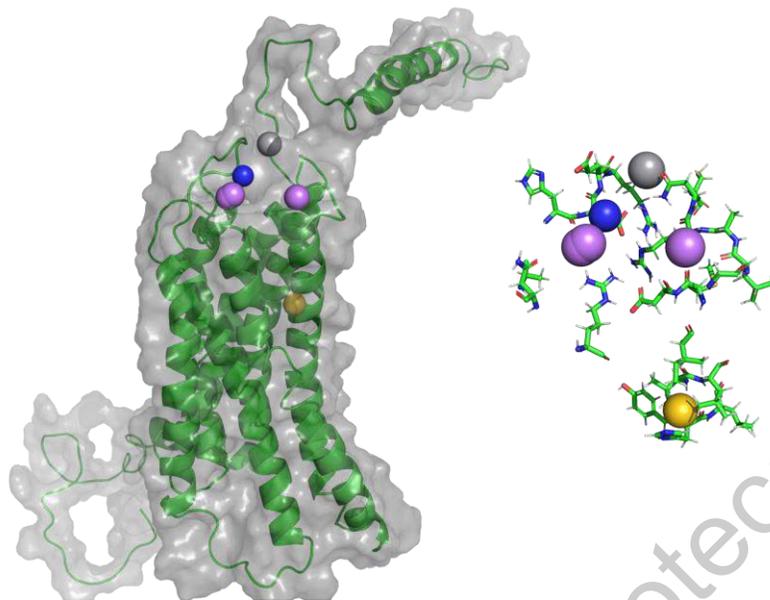
Para proveer información útil para el diseño de nuevos antagonistas para CXCR3, se construyó un modelo general de interacciones proteína-ligando basado en 894 ligandos reportados como antagonistas en la base de datos publica ZINCpharmer, obtenidos de en su mayoría de procesos de HTS [59–68]. Este modelo de interacciones es similar a un farmacóforo, el cual es una representación de las entidades químicas o elementos farmacofóricos necesarias para el reconocimiento de ligandos en las macromoléculas [160]. Utilizando la conformación de F0 de la simulación del complejo CXCR3-CXCL10 CG-MD para observar si los antagonistas pueden unirse de manera adecuada antes de que los dos pasos de activación del receptor ocurran, por lo que la estructura de CXCL10 fue removida del complejo y se realizó un acoplamiento molecular. Una vez obtenidos los complejos, las interacciones se agruparon para la construcción del modelo general y observar las entidades químicas en una posición tridimensional. Las coordenadas del modelo se presentan en el Anexo II.

El modelo general de interacciones obtenido para la conformación inactiva de CXCR3, muestra la que la posición de los elementos farmacofóricos HAc, HDn y PIn se localiza en los *loops* extracelulares y entre los segmentos transmembranales 5 y 6 un elemento farmacofórico de tipo Hph (Figura 22). Los residuos alrededor de 5 Å se muestran el Tabla 9.

**Table 9.** Elementos farmacofóricos F0 CXCR3-CXCL10 CG-MD.

Elemento farmacofórico	Residuos (5 Å)
HAc	A192, <b>H194</b> , <b>D195</b> , R212, M281, D282, G284, L286, A287, <b>R288</b>
HDn	<b>D195</b> , <b>E196</b> , <b>R197</b> , N289, C290
Hph	Y271, H272, L273, V275, L276, I279
PIn	<b>H194</b> , <b>D195</b> , <b>E196</b> , <b>R197</b> , <b>R288</b>

En negritas se presenta los residuos repetidos en los diferentes elementos farmacofóricos.



**Figura 22.** Modelo general de interacciones en F0 del complejo CXCR3-CXCL10-GP. En magenta HAc, gris HDn, amarillo Hph y en azul Pin.

Los residuos R197 y R212 se encontraron alrededor de los elementos farmacofóricos son relevantes para la unión y actividad de todas las quimiocinas; D282 es relevante para la unión y actividad de CXCL9 y CXCL10. Adicionalmente, se presentan residuos alrededor de la secuencia CWTP (secuencia conservada en GPCRs de clase A, CWxP), relacionados a la rotación de TM6 necesario para la activación de TM6 [56], cercanos al elemento farmacofórico Hph. Este modelo general sugiere que los antagonistas pueden inhibir la interacción con las quimiocinas e inhibir la rotación de TM6 para evitar la activación del receptor. El modelo general presenta 6 elementos farmacofóricos que proveen información de las características de los compuestos e interacciones con residuos relevantes para la unión de los compuestos, lo cual puede servir para futuros diseños racionales de antagonistas de CXCR3.

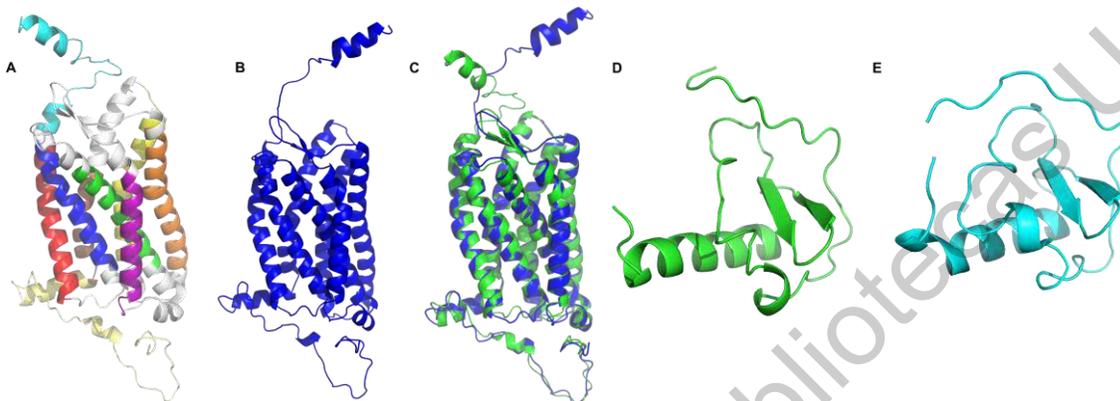
### **7.3. Estudio computacional de la activación del receptor a quimiocina CXCR6**

#### **7.3.1. Activación de CXCR6**

Utilizando como plantilla la cadena A del receptor CCR5, con una identidad de secuencia de 34.74 % y de CCL20 con una identidad de secuencia de 31.25 % calculado en el servidor BLAST [128,129], se modelaron las estructuras de CXCR6 y CXCL16s, respectivamente. Una vez obtenidos los modelos de CXCR6 y CXCL16s, se realizó una simulación de 5 ns para relajar el modelo de CXCL16s y en el caso de CXCR6 solo se realizó la minimización y el equilibrio del sistema, una vez reorientado el NH<sub>2</sub>-T.

### 7.3.1.1. Relajación de los modelos por homología

El modelo de CXCR6 reorientado se minimizó y equilibrio bajo los parámetros sugeridos por el protocolo de CHARMM-GUI y CXCL16s se sometió a una dinámica de 5 ns para mejorar su calidad, el alineamiento de los modelos originales y las estructuras obtenidas de los procesos de minimización y equilibrio y del clúster más representativo de la simulación AA-MD mostró un RMSD de 1.202 Å para el caso de CXCR6 y de 2.602 Å para CXCL16s (Figura 23).

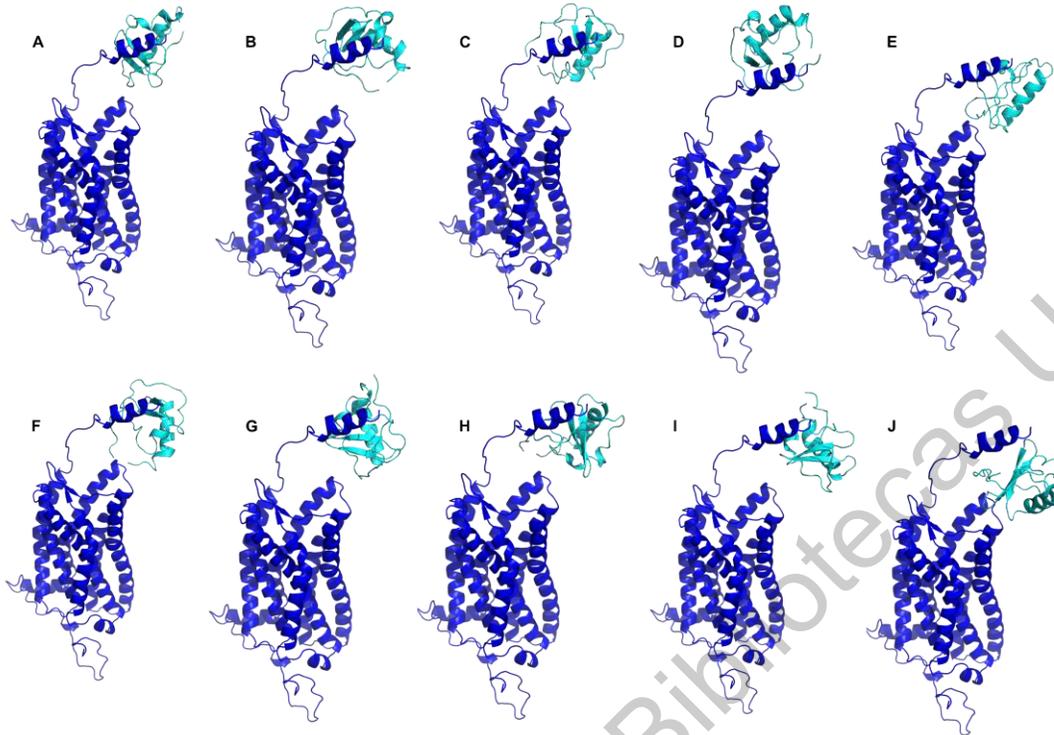


**Figura 23.** Estructura de CXCR6 y CXCL16s. A) CXCR6-M1. En turquesa se representa el NH<sub>2</sub>-T, en rojo TM1, en azul TM2, en verde TM3, en púrpura TM4, en naranja TM5, en amarillo, TM6, en café TM7, y en amarillo claro el COOH-T. B) CXCR6 reorientado, C) Alineamiento de CXCR6-M1 y CXCR6-minimizado, C) CXCL16s-M1 y D) CXCL16s-C1.

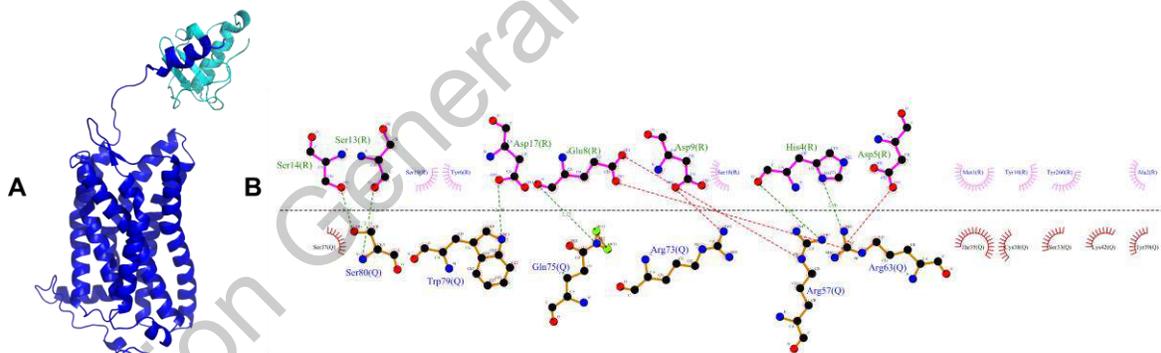
Una vez minimizada y equilibrada la estructura de CXCR6 los residuos favorables en el RP fueron de 91.76 %, indicando que la estructura obtenida es útil para los estudios posteriores. En el caso de CXCL16s, el cluster1 presento un porcentaje de residuos favorables en el RP de 89.19 %, indicando que la estructura es apropiada para los estudios posteriores.

### 7.3.1.2. Construcción del complejo CXCR6-CXCL16s

Utilizando la estructura minimizada de CXCR6 y el cluster1 de CXCL16s, el acoplamiento proteína-proteína se realizó en el servidor ClusPro, para observar las interacciones preliminares entre las dos estructuras y posicionar a CXCL16s en complejo con CXCR6 para la simulación CG-MD. El acoplamiento fue realizado con una restricción de interacción con los primeros 26 residuos de CXCR6, basado en datos experimentales de mutagénesis de otros receptores de quimiocinas como CXCR3 [4]. Diecisiete modelos de interacción fueron construidos en ClusPro combinando las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Figura 24). La conformación que se eligió para la simulación CG-MD fue la que presento un mayor número de conformaciones en el clúster basado en la combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Las interacciones polares entre CXCR6 y CXCL16 del mejor acoplamiento se presentan en la Figura 25.



**Figura 24.** Mejores 10 modelos obtenidos del servidor ClusPro. A) Modelo0, B) Model1, C) Modelo2, D) Modelo3, E) Modelo4, F) Modelo5, G) Modelo6, H) Modelo7, I) Modelo8, J) Model9. El modelo0 fue el que se utilizó para los estudios posteriores.



**Figura 25.** Acoplamiento molecular de CXCR6-CXCL16s. A) Complejo CXCR6-CXCL16s, B) Diagrama de interacciones, R es CXCR6 y Q es CXCL16s; el ambiente hidrofóbico se representa por residuos en rojo y rosa, las interacciones iónicas por líneas punteadas rojas y los puentes de hidrógeno por líneas punteadas verdes.

En las interacciones preliminares entre CXCL16s y CXCR6, residuos de naturaleza ácida en CXCR6 como E8, D9 y D17 interactúan con residuos básicos en CXCL16s, coincidiendo con lo visto en CXCR3 y sus respectivas quimiocinas. El residuo N16 en CXCR6 presenta una glicosilación, la cual se mantuvo en los procesos de minimización y equilibrio, pero fue removida en el acoplamiento

molecular debido a que el servidor ClusPro no reconoció la estructura de la modificación postraducciona. Este residuo no se presenta en las interacciones polares ni en el ambiente hidrofóbico; sin embargo, CXCL16s respeta la restricción e interactúa con los primeros 26 residuos del NH<sub>2</sub>-T.

### 7.3.1.3. Simulación 1 $\mu$ s CG-MD de CXCR6.

Una vez obtenido el complejo CXCR6-CXCL16s se construyó el sistema para realizar las simulaciones de 1  $\mu$ s CG-MD, todos los *frames* (cada 100 ns) fueron convertidos a topología *all-atom* en el módulo “All-atom converter” de Martini Maker, se obtuvieron las estructuras representativas de cada *frame* de las 5 simulaciones en la opción de Average Structure del módulo Structure Analysis de la versión académica de Schrödinger Maestro. Este módulo revisa la simetría local y conectividad (como la orientación de los anillos) de las estructuras en comparación con la estructura promedio lo cual reduce el RMSD y selecciona la estructura con menor RMSD como la estructura representativa del grupo. Se realizó un análisis de cada conformación a 100 ns (F0-F10), utilizando la conformación obtenida después de los procesos de minimización y equilibrio a tiempo 0 (F0) como control para obtener los ángulos de rotación y las interacciones polares de las estructuras representativas de cada *frame* obtenidas en las 5 simulaciones CG-MD realizadas; adicionalmente, se realizó un análisis de RMSD y RMSF de los segmentos transmembranales y los *loops* extra e intracelulares para observar de manera completa el comportamiento del receptor con y sin estímulo de CXCL16s (CXCR6 CG-MD y CXCR6-CXCL16s CG-MD).

El receptor CXCR6 no presenta la secuencia conservada DRY, sino que presenta una mutación y dicha secuencia es DRF. Esta mutación parece estar relacionada con la adhesión celular promovida por CXCL16m, pero aún no está claro su papel en la quimiotaxis promovida por CXCL16s.

### Cambios conformacionales en la simulación de CXCR6 CG-MD

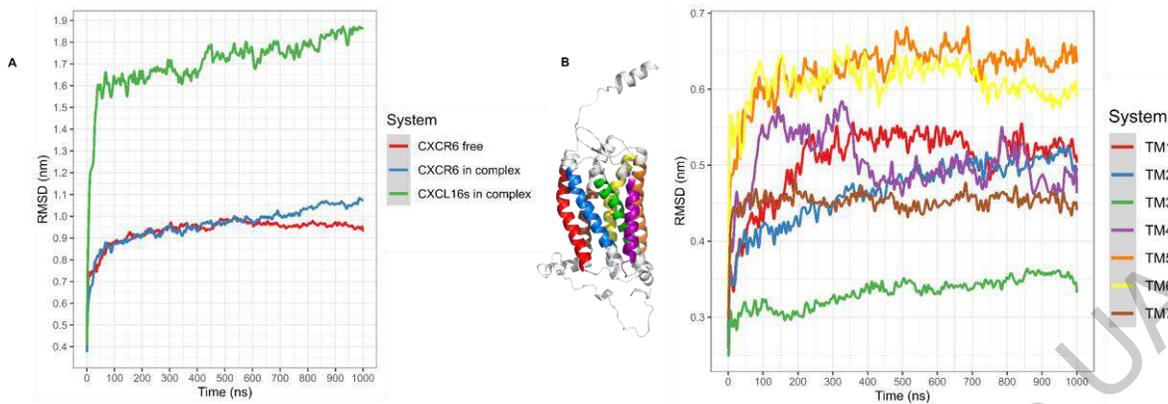
La Tabla 10 presenta los residuos de los segmentos transmembranales considerados en este estudio, obtenidos de UniProt (código: O00574), para los análisis de RMSD, RMSF, rotación de TMs e interacciones polares entre los TM [158]. Debido a que Martini Maker no cuenta con los parámetros de moléculas pequeñas, las modificaciones postraduccionales como las glicosilaciones no fueron adicionadas en el complejo para la simulación.

**Table 10.** Residuos de los segmentos transmembranales de CXCR6.

TM1	TM2	TM3*	TM4	TM5	TM6	TM7
33–59	69–89	104–128	144–164	188–215	232–259	276–293

\*The residues of DRF are included (126–128).

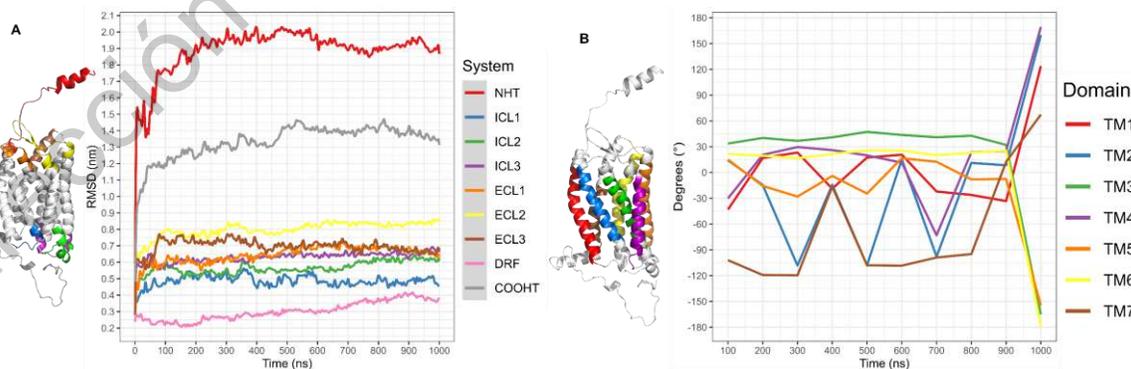
El Sistema presenta cambios antes de los 100 ns relacionados a la búsqueda del equilibrio en el sistema, posterior a los 100 ns el sistema se mantiene estable hasta el final de la simulación (Figura 26A, línea roja).



**Figura 26.** RMSD de la simulación de CXCR6 CG-MD. A) RMSD CXCR6, CXCR6 en complejo con CXCL16s y CXCL16s. B) RMSD de los TMs de la simulación CXCR6 CG-MD.

En el caso del RMSD de los TMs, todos presentan gran movimiento antes de los 100 ns, después de este tiempo, TM5 y TM6 muestran mayor RMSD en comparación con los demás TMs, sin embargo, se mantienen con movimientos discretos en el resto de la simulación con ligeros cambios a 400 y 700 ns. Por otro lado, TM4 presenta dos picos relevantes de RMSD a 300 y 700 ns. TM3 es el segmento con menor movimiento incrementado a los 200 ns. TM2 incrementa su movimiento a través de la simulación, mientras que TM1 presenta dos picos relevantes; el primero entre 100-300 ns y el segundo a 650-800 ns. TM7 presenta un menor movimiento comparado con TM1, TM2, TM4, TM5 y TM6, sin cambios relevantes en el resto de la simulación (Figura 26B).

En el caso de los *loops* intracelulares y extracelulares (ICLs y ECLs, respectivamente), los extremos NH<sub>2</sub>-T y COOH-T presentan mayor movimiento en comparación con los ICLs y ECLs, como es esperado al ser extremos con libertad de movimiento. ECL2 es el *loop* con mayor movimiento, mientras que, ICL1 es quien presenta el menor movimiento durante la simulación. La secuencia DRF, es un punto interesante para analizar y tratar de observar su participación en la activación de CXCR6 por estímulo de CXCL16s, tiene un comportamiento estable con una ligera variación alrededor de 600-1000 ns (Figura 27A).



**Figura 27.** RMSD y ángulos de rotación de la simulación CXCR6 CG-MD. A) RMSD de los loops y B) Rotación de los segmentos transmembranales.

Adicionalmente, la rotación de los TMs fue calculada para observar el comportamiento de los TMs en la simulación (Figura 27B). TM1, TM2 y TM4 tienen mayor rotación a lo largo de la simulación, a 600-700 ns TM1, TM2, TM4 y TM5 presentan un pico de rotación a los 600-700 ns. TM3 y TM6 son los TMs con menor rotación, mientras que TM2 y TM4 se mantienen con cambios constantes en la simulación. Esto indicaría que el movimiento de TM2 y TM4 es relevante para mantener una conformación funcional del receptor CXCR6.

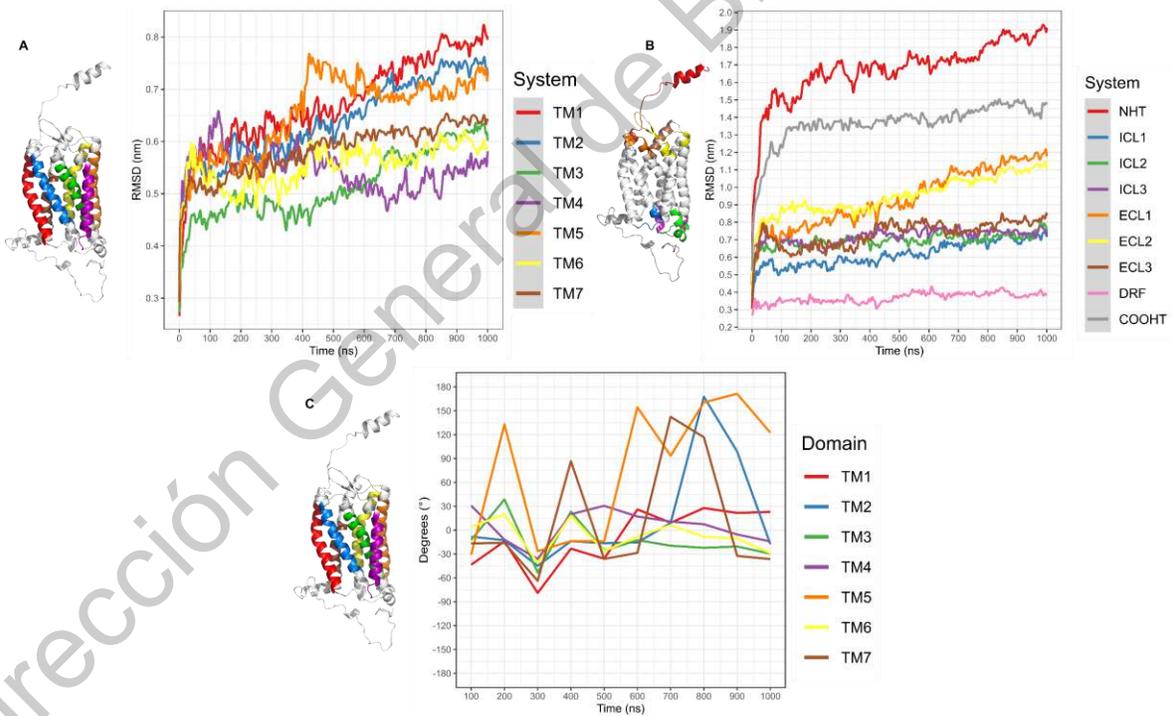
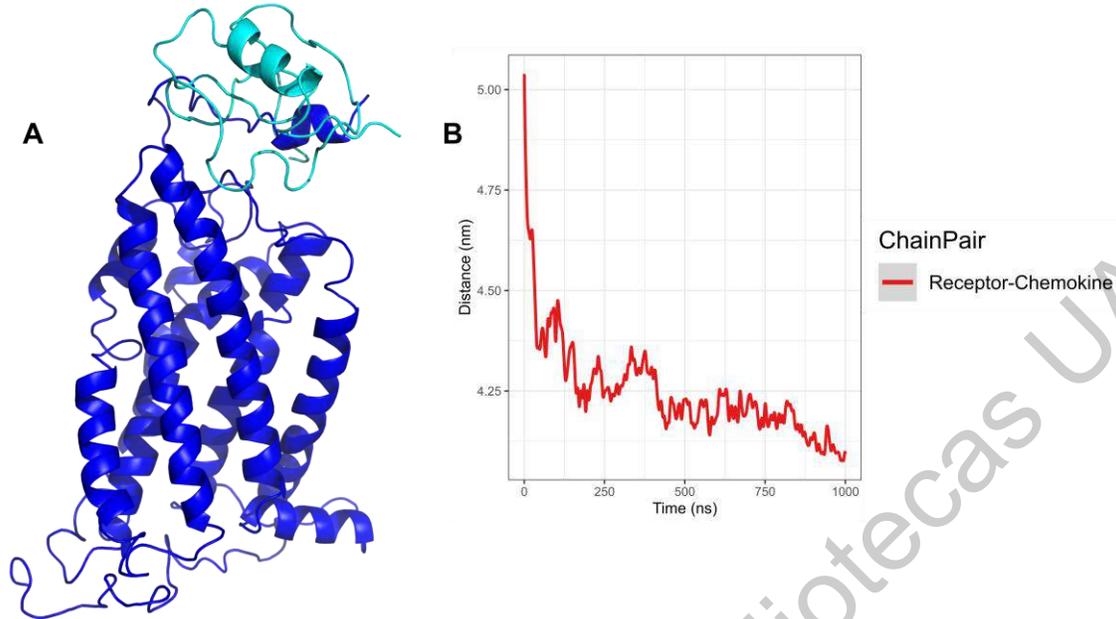
Por otro lado, el análisis de las interacciones polares entre los TMs (Anexo III) arrojó que el residuo D77 (TM2) presenta una interacción constante con el residuo R280 (TM7) durante toda la simulación, mientras que las interacciones entre TM2-TM3 se presentan en la mayoría de los *frames*, principalmente entre A76 y D77 (TM2) con N112 (TM3). TM3 y TM4 interactúan de manera constante mediante T110 (TM3) y S163 (TM4), TM3 también interactúa con TM6 mediante F113 (TM3) y Q244 (TM6) y S116 (TM3) con F240 (TM6). Por otro lado, TM5 y TM6 interactúan en toda la simulación mediante los residuos S188 (TM5) con K251, R254 y S255 (TM6) y Q195 (TM5) con Q244 (TM6). Por su parte, TM6 interactúa de manera constante con TM7 mediante T243 (TM6) y R280 (TM7). La secuencia DRY de tres residuos (ácido aspártico, arginina y tirosina), es una secuencia conservada en los GPCRs de clase A y es relevante para la estabilización de los estados activo-inactivo en GPCRs, una vez que el *arginine cage* (interacción entre D y R) se pierde, R interactúa con la subunidad  $\alpha$  en la GP [4,52,53]. Sin embargo, esta secuencia en CXCR6 está conformada por ácido aspártico, arginina y fenilalanina; la secuencia DRF se ha propuesto como una adaptación para la adhesión celular cuando el receptor interactúa con CXCL16m [55].

Para observar el comportamiento de la secuencia DRF, en un esfuerzo de elucidar su función, las interacciones polares en cada *frame* fueron analizadas (Anexo III). La ruptura del *arginine cage* entre D126-R127 se presenta de 800-1000 ns, coincidiendo con la disminución de interacciones con TM2-TM3 y TM3-TM4. R127 presenta interacciones, antes de la ruptura de esta interacción, entre la cadena lateral y la cadena principal de I123, Q225, Q141 y F224. A 800-1000 ns, la cadena lateral de R127 interactúa con Q141 y F224.

#### 7.3.1.4. Simulación 1 $\mu$ s CG-MD del complejo CXCR6-CXCL16s.

En las conformaciones obtenidas de la simulación CXCR6-CXCL16s CG-MD el NH<sub>2</sub>-T se orientó hacia los *loops* extracelulares y la distancia entre CXCR6 y CXCL16 disminuye a lo largo de la simulación, alcanzando el equilibrio en distancia alrededor de los 500-750 ns (Figura 28) y para el final de la simulación, la distancia entre la quimiocina y el receptor disminuye.

El RMSD de CXCR6 en complejo con CXCL16 muestra un moderado y continuo aumento; a 600 ns, el RMSD tiene un ligero aumento hasta el final de la simulación (Figura 26A, línea azul). Por su parte, CXCL16s presenta un comportamiento más drástico en RMSD y un continuo incremento durante la simulación (Figura 26A, línea verde).



El comportamiento de los TMs en RMSD fue diferente en comparación con los TMs sin estímulo de CXCL16s. Todos los TMs están en equilibrio antes de los 400-500 ns, después de este tiempo TM1, TM2, TM3 y TM5 incrementan su movimiento. En contraste, TM4 disminuye su movimiento y TM6

se mantiene con un movimiento discreto (Figura 29A). El RMSD de los ICLs y ECLs indica que el ECL1 y ECL2 son los *loops* con mayor movimiento comparando con ECL3 y los ICLs y de manera esperada el NH<sub>2</sub>-T y el COOH-T son quienes mayor movimiento presentan. La secuencia DRF muestra un cambio discreto en RMSD a 400 ns (Figura 29B). Adicionalmente, la rotación de los TMs fue variable, teniendo a TM5 como el segmento con mayor rotación. A 600 ns TM1, TM2, TM5 y TM7 presentan rotación relevante, mientras, TM3, TM4 y TM6 disminuyen su rotación. Previo a los 600 ns todos los TMs presentan variaciones en la rotación.

En el complejo CXCR6-CXCL16s se observó el “modelo de interacción de dos sitios”, propuesto para la interacción de quimiocinas con sus receptores, este modelo propone que el receptor reconoce a la quimiocina por medio del llamado *docking domain* o dominio de acoplamiento en la quimiocina, localizado en el *loop* después de las primeras dos cisteínas [46], facilitando el posicionamiento de la misma e incrementando las interacciones entre CXCL16s y CXCR6 para inducir los cambios conformacionales relacionados a la activación del receptor.

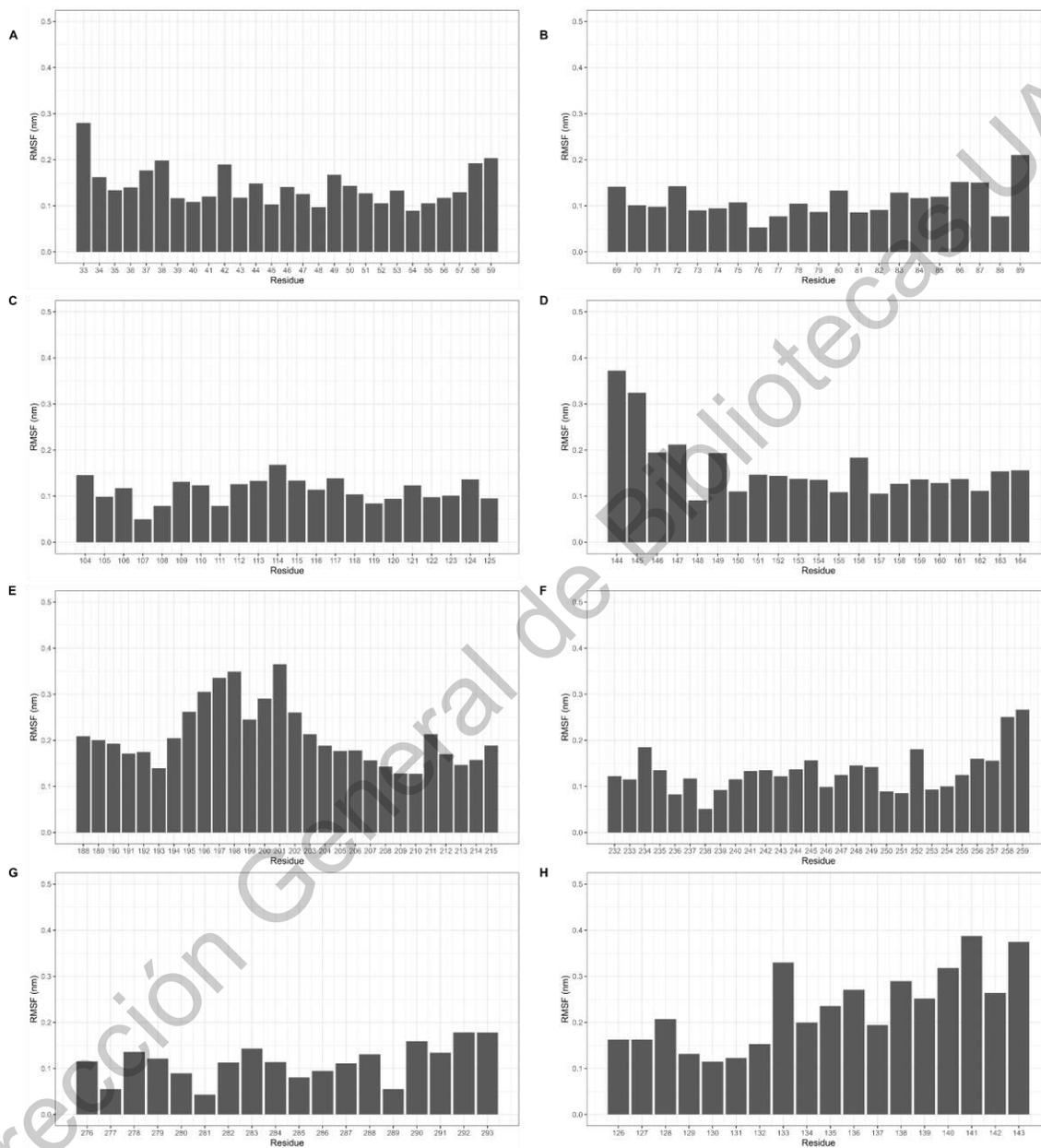
Los residuos involucrados en las interacciones entre CXCR6 y CXCL16s (Anexo III) son en su mayoría residuos de naturaleza ácido como ácido aspártico y glutámico por parte de CXCR6 y residuos de carácter básico como lisina y arginina en CXCL16s, coincidiendo con lo reportado previamente para la interacción entre quimiocinas y receptores. La interacción entre E259 (CXCR6) y R43 (CXCL16s) se presentó en toda la simulación. Mientras que los residuos R63, R67 y R73 estuvieron en constante interacción con residuos de naturaleza ácida en CXCR6 en la simulación.

Las interacciones polares entre los TMs (Anexo III) mostraron interacciones que el TM1 sólo presenta pocas interacciones con TM7 mediante N49 (TM1) y P285 (TM7). Por otro lado, TM2 interactúa de manera constante con TM7 (D77-R280) y disminuye las interacciones con TM3 en presencia de CXCL16s. TM3 interactúa de manera constante con Q244 en TM6; TM4 presenta pocas interacciones con TM2 y TM3. TM5 pierde interacciones con TM6, las interacciones de Q195 con Q244 y N248 se pierden en presencia de CXCL16s. Las interacciones Q195-Q244, N248 se presentan de manera constante en la simulación de CXCR6 CG-MD, indicando que estas interacciones son relevantes para estabilizar el estado inactivo de CXCR6. Por último, TM6 interactúa con TM7 mediante T243 y R280. Los cambios en las interacciones de los TMs se atribuyen a la presencia de la quimiocina en contacto con CXCR6, la cual rompe la interacción entre TM5 y TM6. Adicionalmente, el *arginine cage* se pierde a 500 ns y la cadena lateral de R127 interactúa con I65, T66, Y138, Y288 y S292 (Anexo III).

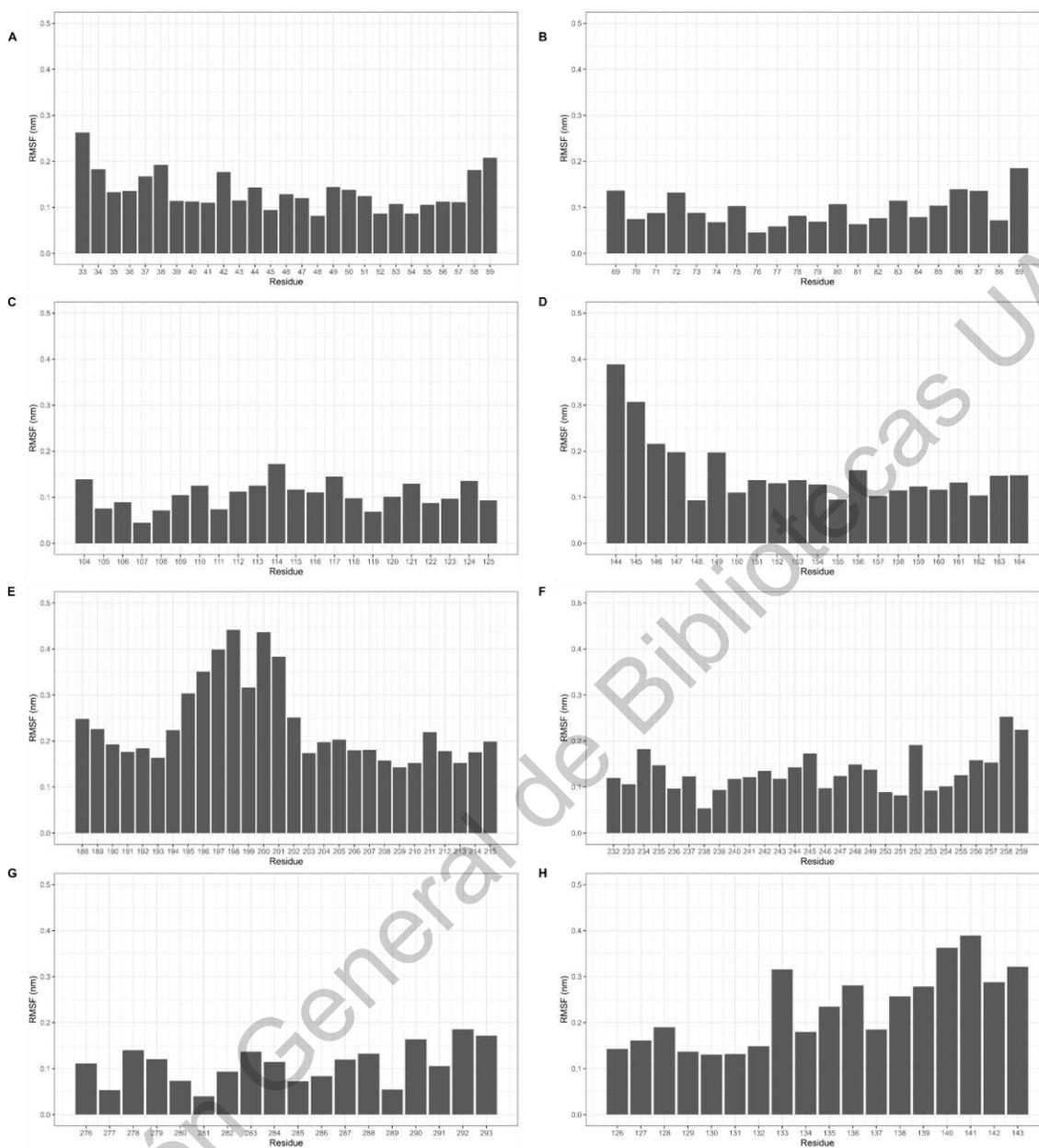
Contrastando el RMSF, que nos indica el cambio de RMSD por residuo a lo largo de la simulación, de los TMs y el ICL2 (el cual contiene la secuencia DRF), algunos residuos relevantes incrementan o disminuyen el movimiento en presencia de CXCL16s (Figura 30 y 31).

Los cambios más representativos se dan en Y109 en TM3, el cual disminuye su movimiento aproximadamente 0.15 nm, N112 y F113 aproximadamente 0.05 nm, en contraste, F194 y Q195 incrementan el RMSF aproximadamente 0.05 nm, mientras que M196, T197, L198, G199 y F200

incrementan aproximadamente 0.1 nm. Adicionalmente, la secuencia DRF aumenta de manera ligera su movimiento, donde R127 y F128 son los residuos con mayor RMSF.



**Figura 30.** RMSF de los TMS y del ICL2 de la simulación CXCR6 CG-MD.



**Figura 31.** RMSF de los TMs y el ICL2 de la simulación CXCR6-CXCL16s CG-MD.

La simulación CG-MD permitió observar los dos pasos de la activación de los receptores a quimiocina: 1) la interacción y disminución en la distancia entre CXCL16s y CXCR6 y 2) el cambio conformacional y rotación en los segmentos transmembranales en CXCR6, derivados de la interacción con la quimiocina [44,45,161]. Interacciones entre TM2-TM3, TM2-TM4, TM2-TM7, TM3-TM6, TM5-TM6 y TM6-TM7 se presentaron en ambas simulaciones, las interacciones entre TM2-TM4 disminuyen y las interacciones entre TM5-TM6 mediante Q195-Q244 y N248 se pierden en presencia de CXCL16s. Las interacciones entre D77-R280 y T243-R280 se pueden relacionar con la conformación funcional de CXCR6, mientras que, la interacción entre Q195-Q244 y N248 puede relacionarse con el estado inactivo del receptor, ya que la pérdida de estas interacciones y la ruptura

del arginine cage se presentan cuando existe el estímulo de CXCL16s, permitiendo el cambio hacia el estado meta-activo de CXCR6.

### 7.3.2. Modelo general de interacciones proteína-ligando en CXCR6

Con el objetivo de proveer información relevante para el diseño de nuevos antagonistas para CXCR6 se construyó un modelo general de interacciones proteína-ligando, basado en 82 ligandos reportados como antagonistas para CXCR6, obtenidos por optimización estructural [36]. La estructura representativa del *frame* inicial (F0) de la simulación CXCR6 CG-MD fue utilizada para el acoplamiento molecular, debido a que en esta conformación el receptor aún no tiene el estímulo de la quimiocina. Una vez obtenidos los complejos de acoplamiento molecular, las interacciones fueron agrupados para la construcción del modelo y observar los elementos farmacofóricos relevantes para el antagonismo de CXCR6 en una disposición tridimensional, considerando el pIC50 de los ligandos (Anexo III). El ligando 75 fue el que obtuvo un mejor *docking score* (-10.74 kcal/mol), mientras que el ligando 82 con el mejor pIC50 (7.40) con un *docking score* de -8.92 kcal/mol. El modelo general basado en el pIC50 presenta tres elementos farmacofóricos relevantes: HAc, HDn, y Hph, distribuidos en el espacio entre los ECLs y los TMs (Figura 32AB); los residuos alrededor de 5 Å se presentan en la Tabla 11 y las coordenadas del modelo se presentan en el Anexo III.

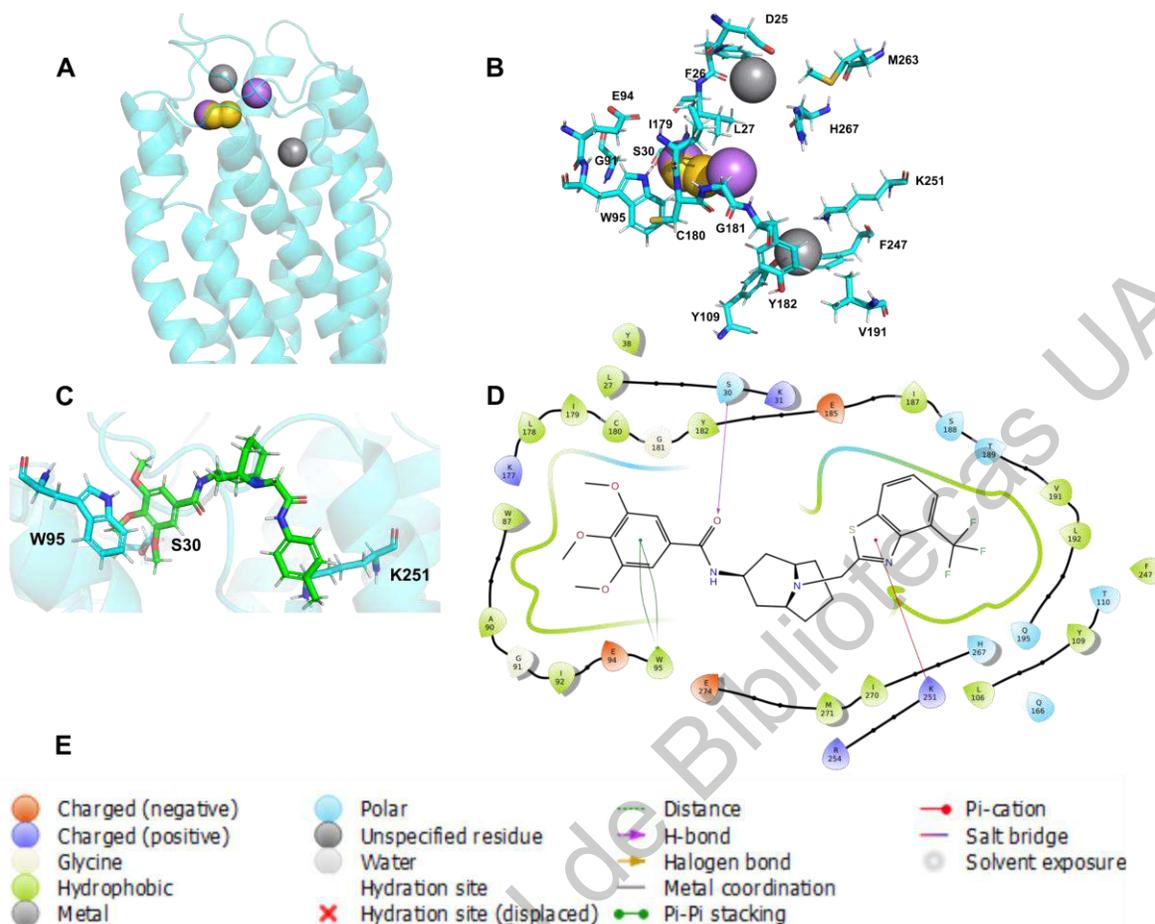
**Table 3.** Elementos farmacofóricos del modelo general basado en pIC50

Elementos farmacofóricos	Residuos alrededor de 5 Å
HAc	<b>L27, S30</b> , G91, E94, <b>W95, I179, C180</b> , G181, <b>Y182</b>
HDn	D25, F26, <b>L27</b> , Y109, <b>Y182</b> , V191, F247, K251, M263, H267
Hph	<b>L27, S30, W95, I179, C180</b>

En negritas los residuos repetidos en los diferentes elementos farmacofóricos.

El elemento farmacofórico HDn se posiciona cercano a Y109 y K251 en TM3 y TM6, estos segmentos están involucrados en la conformación funcional de CXCR6, bloqueando la rotación o las interacciones polares de estos segmentos, es posible desestabilizar al receptor y bloquear su función. En contraste, HAc y Hph se posicionan cercanos a los ECL1 y ECL2 lo cual podría bloquear las interacciones de CXCL16s con los ECLs.

El ligando 82 interactúa con W95 (Figura 32D), residuo presente en el modelo general, el cual puede actuar como punto de anclaje para los anillos aromáticos ricos en electrones, como el grupo 2,3,4-trimetoxifenilo, para la unión de los antagonistas con CXCR6. Bloqueando el movimiento y la interacción de TM3 y TM6, las moléculas pueden antagonizar a CXCR6. Adicionalmente, la posición del ligando 82 es cercana a los residuos Q195 y E274, residuos clave en la conformación inactiva de CXCR6 y en la unión de CXCL16s, respectivamente.



**Figura 32.** Modelo general de interacciones proteína-ligando basado en el pIC50. A) Modelo general, en magenta HAc, en gris HDn y en amarillo Hph, B) residuos alrededor de 5 Å, C) conformación tridimensional del ligando 82, D) Diagrama de interacción del ligando 82.

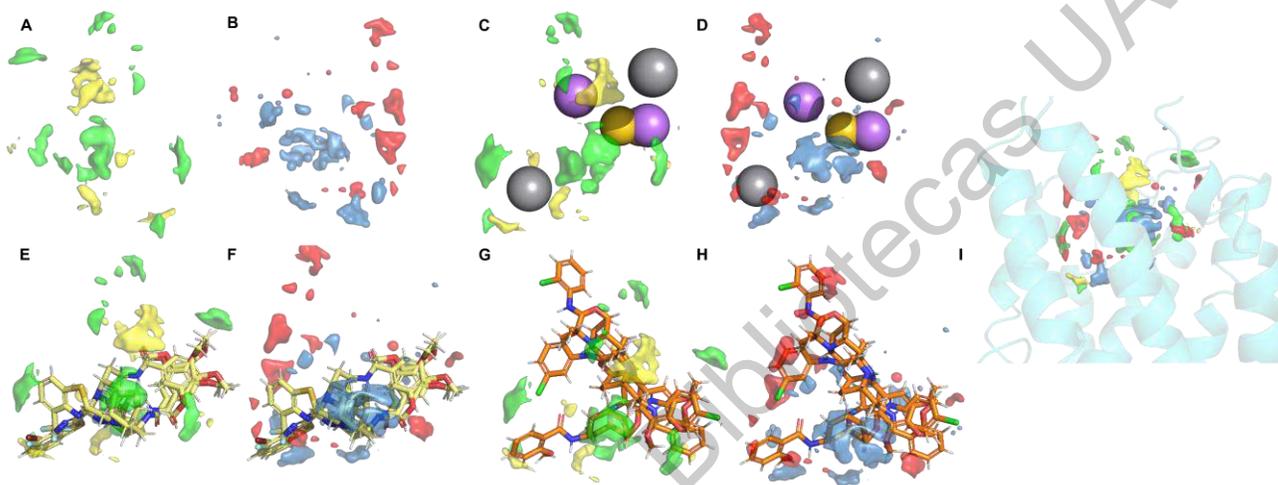
### 7.3.3. Modelo 3D-QSAR basado en el receptor

En adición a la información obtenida del modelo general de interacciones proteína-ligando, un análisis 3D-QSAR se realizó para verificar los elementos farmacofóricos relacionados con la actividad de los 82 ligandos. Diez modelos fueron construidos y los parámetros estadísticos considerados para la selección de los 3 mejores modelos fueron la predictibilidad del modelo ( $q^2 > 0.5$ ), la linealidad del modelo ( $R^2 \geq 0.85$ ), y la significancia del modelo (estadístico  $F$ ), calculados en OPEN3DQSAR. Los campos estéricos (VdW) y electrostáticos fueron calculados para todas las moléculas, el grupo de prueba consistió en 23 moléculas seleccionadas al azar. La tabla 12 presenta los datos estadísticos y los ligandos del grupo de prueba de los mejores 3 modelos, la estadística de todos los modelos se presenta en el Anexo III.

**Tabla 4.** Valores estadísticos de los modelos 3D-QSAR.

Modelos	$q^2$	$R^2$	F-Test	Grupo de prueba
Modelo 7	0.6397	0.8731	72.8899	18, 74, 38, 2, 72, 80, 28, 52, 16, 15, 12, 73, 70, 26, 47, 13, 32, 54, 65, 62, 59, 79, 56
Modelo 1	0.6329	0.8639	67.2740	33, 30, 39, 22, 61, 28, 36, 53, 9, 66, 56, 59, 24, 48, 72, 18, 2, 52, 13, 41, 62, 46, 75
Modelo 4	0.4906	0.8718	72.0680	27, 50, 25, 9, 2, 23, 14, 67, 41, 70, 33, 28, 39, 79, 66, 36, 13, 1, 71, 55, 82, 3, 76

La variable dependiente utilizada en los cálculos del 3D-QSAR fue el pIC50, siendo el modelo 7 el mejor calculado ya que presento una  $R^2$  arriba de 0.8 y con una predictibilidad aceptable. Este modelo fue utilizado para la representación de las principales entidades químicas en la interacción con CXCR6 y para complementar la información obtenida en el modelo general de interacciones proteína-ligando asociado a los elementos farmacofóricos con la habilidad de unirse y antagonizar CXCR6.



**Figura 33.** Modelo 3D-QSAR. A) Entidades farmacofóricas en el modelo QSAR, en amarillo el campo VdW negativo, en verde el campo VdW positivo, B) Entidades farmacofóricas en el modelo 3D-QSAR, en rojo el campo electrostático negativo, en azul el campo electrostático positivo, C) Superposición del modelo general de interacciones proteína-ligando y los campos VdW, D) Superposición del modelo general de interacciones proteína-ligando y los campos electrostáticos, E) Tres ligandos con mejor pIC50 (82, 81 y 78) en los campos VdW, F) Tres ligandos con mejor pIC50 en los campos electrostáticos, G) tres ligandos con peor pIC50 (51, 56 y 55) en los campos VdW, H) tres ligandos con peor pIC50 en los campos electrostáticos, I) Estructura tridimensional del modelo QSAR.

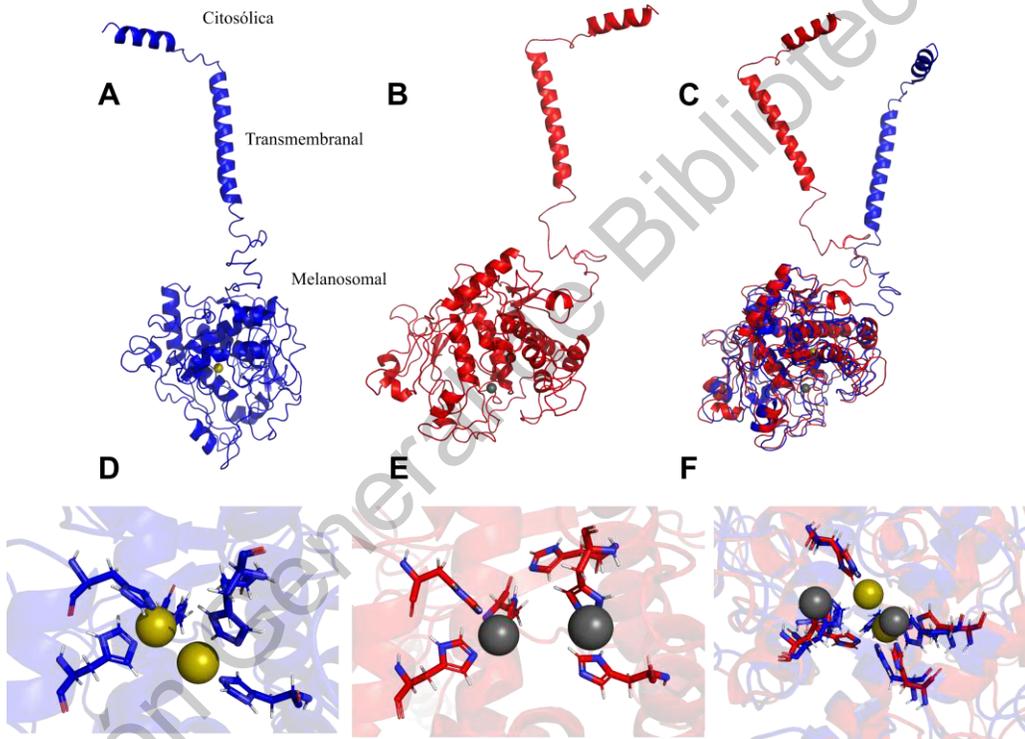
Los campos moleculares de efecto estérico (VdW) y los campos electrostáticos positivos coinciden con la región estérica y electrostática positiva de la subestructura *exo*-azabiciclo[3.3.1]nonano en los ligandos con mejor pIC50 (Figura 33), estando cercano al residuo E274, relevante en la actividad de CXCR6. El anillo de 2,3,4-trimetoxifenilo actúa como punto de anclaje para la unión de los ligandos y el modelo QSAR indica que esa zona requiere subestructuras ricas en electrones y voluminosas. La posición del modelo QSAR coincide con la posición del modelo general basado en pIC50. Los elementos farmacofóricos HpH, HAc y HDn son necesarios para la unión y actividad de los ligandos: HAc provee un campo electrostático negativo y el Hph provee el campo estérico positivo en la región del anillo de 2,3,4-trimetoxifenilo. Superponiendo el modelo 3D-QSAR en la estructura de CXCR6, se orienta hacia los ECLs y TMs. Esta información confirma las observaciones realizadas en las simulaciones de dinámica molecular, donde se espera que la interrupción de las interacciones entre TM3-TM5-TM6 impide al receptor adoptar la conformación meta-activa.

#### 7.4. Estudio computacional activadores alostéricos de tirosinasa

Una vez obtenido el modelo completo de TYR, se construyó el sistema para la simulación TYR-Zn<sup>2+</sup> para relajar la conformación de TYR con los átomos de Zinc y buscar una mejor estabilidad del sitio catalítico.

##### 7.4.1. Relajación del modelo por homología de TYR

Se realizó una simulación de 50 ns AA-MD para relajar la estructura y mejorar la calidad del modelo TYR-M1, el cluster1 presentó una mejora en la calidad pasando de 81.34 % a 86.64 % de residuos favorecidos en el RP. El alineamiento del TYR-M1 con el cluster1 obtenido de la simulación (TYR-Zn<sup>2+</sup>) arrojó un RMSD de 3.050 Å, indicando que el sistema presentó cambios estructurales para obtener una conformación energéticamente más estable (Figura 34).

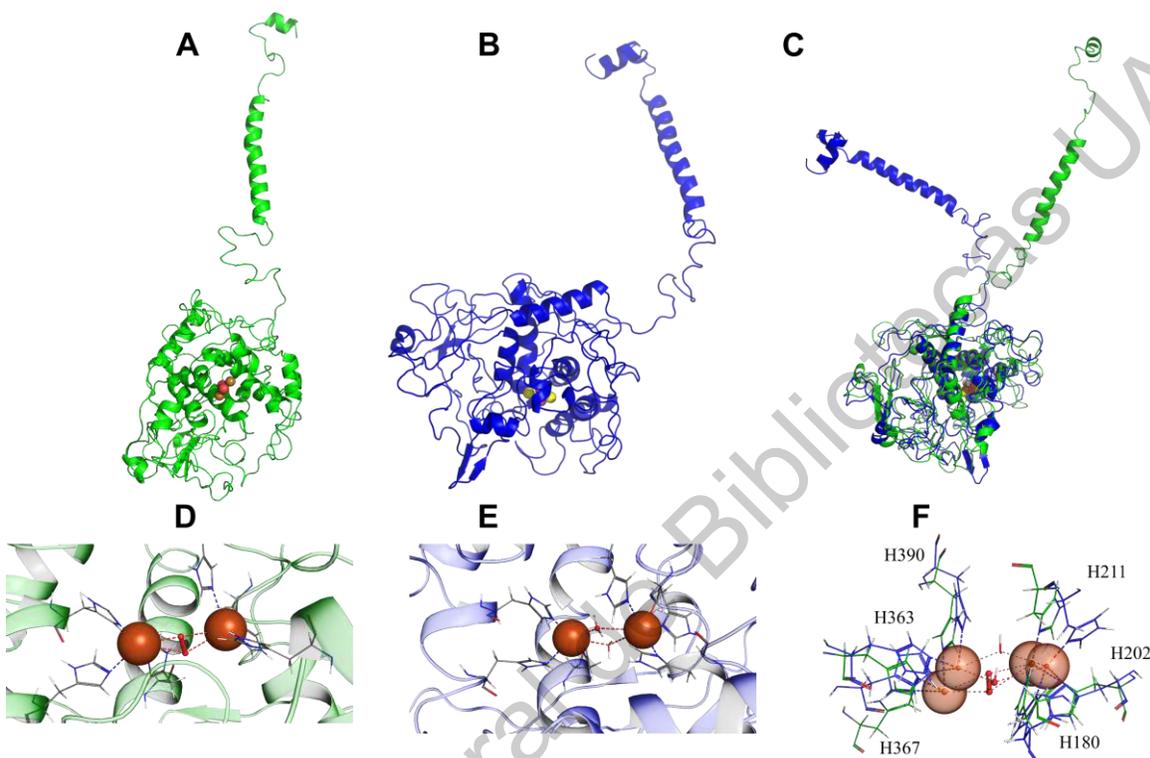


**Figura 34.** Estructuras de TYR. A) TYR-M1, en esferas amarillas se presentan los átomos de zinc, B) TYR-Zn<sup>2+</sup>, en esferas grises se presentan los átomos de Zn<sup>2+</sup>, C) Alineamiento de las estructuras de TYR-M1 y TYR-C1-Zn<sup>2+</sup>, D) Sitio catalítico de TYR-M1, E) Sitio catalítico de TYR-C1-Zn<sup>2+</sup>, F) Alineamiento del sitio catalítico de TYR-M1-TYR-C1-Zn<sup>2+</sup>.

El sitio catalítico de la TYR se conforma por dos átomos de Cu<sup>2+</sup>, donde cada átomo está en coordinación con 3 residuos de histidina (H180, 202, 211, 363, 367 y 390). En la simulación de 50 ns AA-MD, los átomos de Cu<sup>2+</sup> se reemplazaron por átomos de Zn<sup>2+</sup> ya que CHARMM-GUI no tiene parametrizado al Cu<sup>2+</sup>. El cambio más drástico se observa en la región transmembranal, la cual se desplaza más en comparación a la estructura TYR-M1. En el sitio catalítico, los átomos de Zn<sup>2+</sup> se separan en la estructura TYR-C1-Zn<sup>2+</sup> en comparación con el sitio catalítico de TYR-Zn<sup>2+</sup> y un ligero

movimiento de los residuos de histidina. La estructura del cluster1 de la simulación es útil para los estudios posteriores.

#### 7.4.2. Conformación activa e inactiva de la TYR



**Figura 35.** A) TYR-activa, B) TYR-inactiva, C) Alineamiento de las estructuras, D) Sitio catalítico de TYR-activa, E) Sitio catalítico de TYR-inactiva y F) Alineamiento de los sitios catalíticos, en verde TYR-activa, en azul TYR-inactiva.

Utilizando la estructura del cluster1 de la simulación de 50 ns AA-MD de TYR-Zn<sup>2+</sup>, los átomos de zinc fueron reemplazados por átomos de Cu<sup>2+</sup> en el programa Maestro, se construyó el sistema para simulación de 100 ns AA-MD en Desmond. La TYR puede encontrarse en diferentes estados de oxidación durante el proceso de catálisis, en la forma nativa (met) puede encontrarse a los Cu<sup>2+</sup> en coordinación con iones HO<sup>-</sup>, esta forma luego se somete a oxidación para obtener un estado desoxi-inactivo donde la valencia de los Cu<sup>2+</sup> pasa a ser Cu<sup>1+</sup> y están en coordinación con moléculas de agua. Para ser activada, el estado desoxi necesita que los átomos de cobre se coordinen con una molécula de oxígeno lo que promueve el cambio a un estado oxi-activo, donde los Cu<sup>1+</sup> ahora son Cu<sup>2+</sup>, esta forma es capaz de unir y oxidar monofenoles y catecoles [103]. Tomando en cuenta esta información, para TYR-activa se adicionó la molécula de O<sub>2</sub> en complejo con los átomos de Cu<sup>2+</sup>, en contraste, para la estructura de TYR-inactiva, se adicionaron dos moléculas de H<sub>2</sub>O. Los clústeres de las dos simulaciones se presentaron a 38 y 57 ns (activa e inactiva, respectivamente, Figura 35AB). Comparando las estructuras de la forma activa e inactiva de TYR, se observan cambios

relevantes en la orientación del segmento melanosomal, observándose un RMSD 3.481 Å (Figura 35C), así como también una mayor separación de las histidinas en complejo con los  $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$  en la estructura inactiva. Sin embargo, los complejos metálicos  $\text{Cu}^{2+}\text{-oxígeno}$  y  $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$  se mantienen en coordinación con las histidinas, indicando que la estructura del sitio catalítico en las dos conformaciones es representativa de ambos estados.

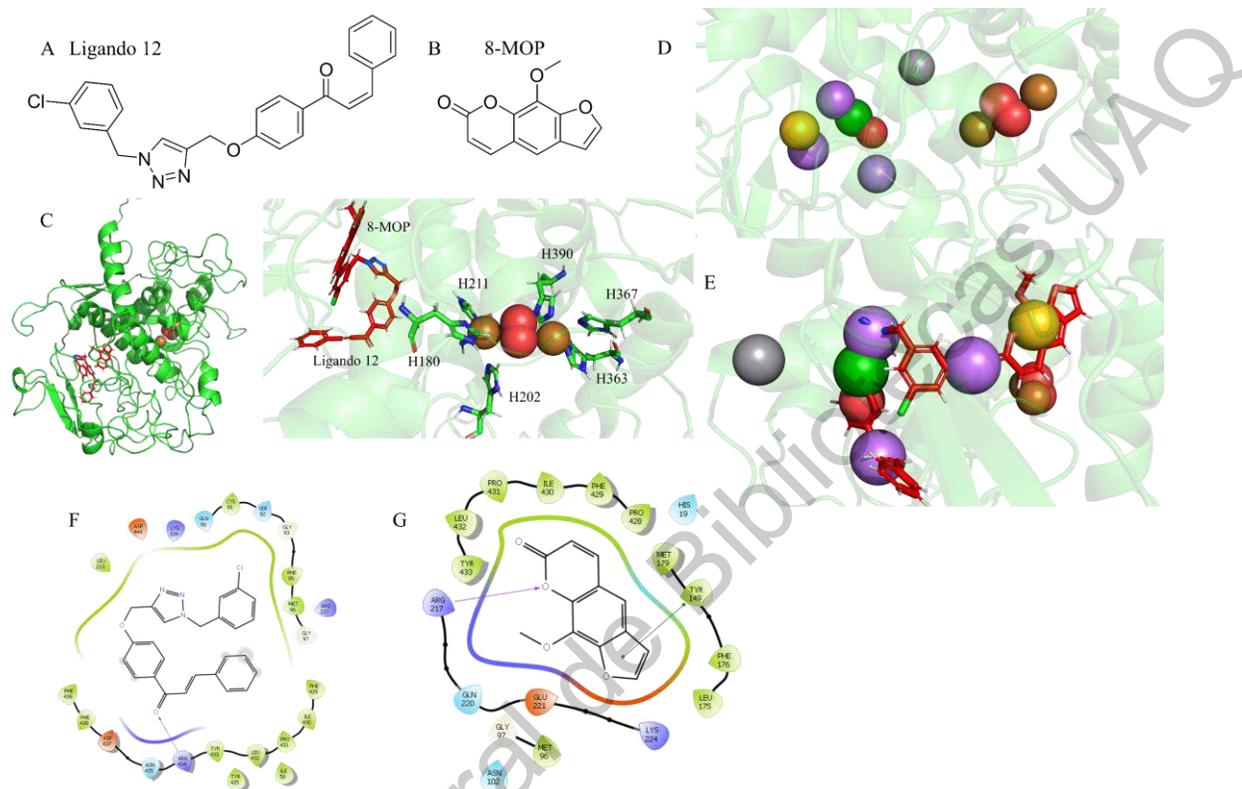
#### 7.4.3. Modelo general de interacciones proteína-ligando para la enzima tirosinasa

Se construyó una biblioteca de 28 ligandos reportados en la literatura como activadores de tirosinasa, mayormente obtenidos por procesos de optimización de derivados de chalconas y furanocumarinas [152,153]. A esta lista se adicionó 8-metoxipsoraleno (8-MOP) como control ya que es un fármaco utilizado para la repigmentación de lesiones de vitíligo y es un activador de TYR.

Se realizó el acoplamiento molecular utilizando la estructura del cluster1 de TYR-activa, basados en la premisa de que los compuestos que provocarían la activación de la enzima serían más afines al estado activo de ésta; el modelo general se construyó basándose en el *docking score* de los ligandos. El ligando 12 fue el ligando con mejor *docking score* con un valor de -9.38 kcal/mol, mientras que el 8-MOP presentó un *docking score* de -6.8 kcal/mol, como se puede ver en el Anexo IV. La posición tridimensional de los ligandos no es en el sitio catalítico (Figura 36), como era de esperarse, se posicionan en una zona cercana, lo cual podría indicar que la presencia de los ligandos en esa zona permite una estabilización del sitio catalítico para llevar a cabo la oxidación de la L-tirosina. El Ligando 12 presenta una sola interacción de tipo puente de hidrógeno con el residuo R434; sin embargo, el ambiente químico hidrofóbico que rodea a la estructura permite una correcta interacción con la TYR (Figura 36F). Por otro lado, el 8-MOP presenta un puente de hidrogeno con el residuo R217 y una interacción de tipo  $\pi\text{-}\pi$  con el residuo Y149 (Figura 36G). De manera interesante, la subestructura perteneciente a la chalcona del ligando 12 es la que presenta la interacción con la estructura de la TYR, las chalconas son naturalmente inhibidores de la TYR; sin embargo, los derivados de isozaxoles demostraron ser activadores de la enzima, aunque en este caso, el anillo de isozaxol no participa en interacciones polares, el ser una estructura privilegiada permite considerar a esta subestructura útil para la actividad de la enzima. Las estructuras del ligando 12 y el 8-MOP, están relativamente cercanas entre ellas, lo que podría indicar que es el sitio de unión es amplio para permitir el acomodo de las estructuras grandes como la del ligando 12 y estructuras pequeñas como la del 8-MOP.

Utilizando el alineamiento de los ligandos en el segundo acoplamiento molecular y el *docking score*, se construyó el modelo general de interacciones proteína-ligando (Figura 36DE), obteniendo 5 elementos farmacofóricos relevantes: Hph, HDn, Arm, HAC y NIn, las coordenadas del modelo se presentan en el Anexo IV. En la superposición del ligando 12 y el 8-MOP observamos la conjunción de las estructuras con los elementos Hph, HAC y Arm, coincidiendo con lo obtenido en los diagramas de interacción. Esto puede indicar que los residuos aromáticos de la zona son necesarios para la unión de los ligandos; sin embargo, para poder determinar si en realidad los compuestos con alta

afinidad podrían activar a la enzima, se necesitaría ver la influencia que esta unión tendría sobre la termodinámica de la reacción, lo que no es posible con las técnicas utilizadas en este trabajo y se requeriría el modelado de la reacción enzimática de hidroxilación por cálculos cuánticos.



**Figura 36.** Acoplamiento molecular de la biblioteca de ligandos. A) estructura del ligando 12, B) 8-MOP, C) Disposición tridimensional del ligando 12 y el 8-MOP, D) Modelo general de interacciones proteína-ligando, en magenta HAc, en gris HDn, en amarillo Hph, en verde Arm y en rojo Nin, E) Superposición de los ligandos 12 y 8-MOP con los elementos farmacofóricos del modelo general, F) Diagrama general de interacciones del ligando 12 y G) Diagrama de interacciones del 8-MOP.

## 8. Conclusiones

### 8.1. Conclusiones particulares.

#### 8.1.1. Activación de CXCR3.

El modelo de CXCR3 fue calculado y utilizado para la construcción de los complejos CXCR3-GP para observar las interacciones con las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 por medio de simulaciones CG-MD. Se observaron interacciones con las glicosilaciones en el complejo CXCR3-CXCL11, indicando que pueden ser necesarias para la unión correcta de CXCL11, pero no para CXCL9 y CXCL10. Una vez que la quimiocina inicia las interacciones preliminares el sistema evoluciona para formar un complejo estable con las tres quimiocinas, para favorecer interacciones de tipo puente de hidrógeno, salino e hidrofóbicas, lo que promueve cambios conformacionales en la rotación y la red de puentes de hidrógeno entre los TMs, confirmando la teoría de activación de dos pasos. En el caso del complejo CXCR3-CXCL10, con la simulación de 250 ns AA-MD se confirmó la importancia de las modificaciones postraduccionales para la unión y actividad de la quimiocina, ya que CXCL10 presenta interacciones con la fosforilación en Y27 y la glicosilación en N32. Los cambios conformacionales en los TMs derivados del estímulo de CXCL10, permitieron la interacción entre el residuo R149, perteneciente a la secuencia DRY, y D193 de la subunidad  $\alpha$  de la GP, promoviendo la separación del complejo  $\beta\gamma$ , conformando para el complejo CXCR3-CXCL10 los dos pasos de activación. Se observó que las interacciones entre N132-D186 y N134-W268 son relevantes para estabilizar el estado activo de CXCR3 en presencia de una GP en complejo con GTP y  $Mg^{+2}$ . Adicionalmente, los elementos farmacofóricos HAc, HDn, Hph y Pln, se presentaron como los más relevantes para la unión y actividad de los antagonistas reportados en la base de datos ZINC; posicionado en dos sitios de CXCR3, la región de los loops extracelulares y en la región entre TM5-TM6. Los antagonistas que se unen en la primera región pueden prevenir la correcta orientación e interacción de las quimiocinas hacia los ECLs y TMs, mientras que, los antagonistas que se unen en la segunda región pueden evitar la rotación de TM6, la cual es relevante para la activación de CXCR3.

#### 8.1.2. Activación de CXCR6

Los modelos por homología de CXCR6 y CXCL16s permitieron observar las interacciones entre la quimiocina y el receptor, así como, el comportamiento de CXCR6 por estímulo de CXCL16s. En la simulación CG-MD, el  $NH_2$ -T en complejo con CXCL16s se posiciona en medio de los ECLs orientándose hacia los TMs, desencadenando la evolución del sistema, movimiento, rotaciones e interacciones de los TMs para llegar al estado meta-activo del receptor.

La interacción entre el residuo D176 y residuos de CXCL16s se corresponde a lo reportado en datos experimentales, otros residuos involucrados en la interacción son residuos de carácter ácido en CXCR6 y de carácter básico en CXCL16s. Interacciones entre E259 y R43 se presenta en todos los *frames* de la simulación, indicando que E259 es relevante para la unión de CXCL16s.

La red de interacciones polares entre TM3, TM5 y TM6 sin estímulo de CXCL16s y las interacciones entre TM2 y TM7, demuestra que estas interacciones están relacionadas con el estado inactivo y la conformación funcional de CXCR6. Cuando CXCL16s interactúa y se orienta hacia los TMs, la rotación de TM5 y TM6 desestabiliza la interacción entre estos receptores y la interacción entre Q195, Q244 y N248 se pierde. Cuando la quimiocina está presente se observan los dos pasos de activación de los receptores a quimiocina. El modelo general de interacciones proteína-ligando, permitió observar los elementos farmacofóricos relacionados con la unión y actividad de los antagonistas de CXCR6; HAc, HDn y Hph son relevantes para la actividad de los antagonistas y para la unión en la zona relacionada con la ruptura de la red de interacciones polares entre TM3-TM5-TM6. La posición tridimensional del ligando 82 ( $pIC_{50}=7.398$ ) cercana a Q195, confirma los resultados obtenidos en la simulación CG-MD, el residuo W95, localizado en el ECL2, actúa como punto de anclaje para el anillo aromático de los ligandos evaluados, los cuales, se orientan hacia TM3 y TM6, segmentos necesarios para la activación de CXCR6.

### *8.1.3. Estudio computacional de activadores alostéricos de tirosinasa*

La obtención de una estructura con el sitio catalítico funcional permitió obtener el modelo general de interacción proteína-ligando, basándose en el docking score del acoplamiento de los ligandos pertenecientes a la biblioteca de 28 estructuras derivados de chalconas y furanocumarinas, el cual presento 5 elementos farmacofóricos relevantes: Hph, HDn, Arm, HAc y NIn. Las interacciones aromáticas e hidrofóbicas parecen ser relevantes en la unión de los ligandos en la tirosinasa. Es interesante como derivados de chalconas, las cuales son inhibidores naturales de la enzima, pueden actuar como activadores alostéricos, los residuos involucrados en la interacción tanto del ligando 12 y del 8-MOP, indican la necesidad de que los activadores incluyan en su estructura anillos aromáticos, aceptores de puentes de hidrógenos y grupos voluminosos.

## **8.2. Conclusiones generales**

Los resultados obtenidos en las simulaciones CG-MD de CXCR3 y CXCR6 permitieron entender el comportamiento de los receptores para llegar al estado meta-activo y ejercer sus funciones de quimiotaxis. Adicionalmente, los modelos generales de interacción proteína-ligando para CXCR3, CXCR6 y TYR, y el 3D-QSAR (CXCR6), permitieron entender los elementos farmacofóricos útiles para la unión y actividad de los antagonistas y los activadores alostéricos. Esta información será útil para el diseño de nuevas moléculas que puedan antagonizar de manera selectiva a los receptores CXCR3 y CXCR6, evitando la unión de la quimiocina o el movimiento de los segmentos transmembranales para llegar al estado meta-activo y, por tanto, reducir la quimiotaxis de células del sistema inmune para evitar la aparición de nuevas lesiones y progresión de las lesiones existentes en pacientes con vitíligo, mientras que el estímulo de TYR permitirá la repigmentación de lesiones existentes en pacientes con vitíligo, por lo que una terapia combinada, sería posible disminuir la progresión y aparición de nuevas lesiones y eliminar las ya existentes, para mejorar la calidad de

vida de los pacientes de vitíligo. Adicionalmente, el antagonismo de CXCR3 y CXCR6 inhibiría procesos como la metástasis de diferentes tipos de cáncer.

## 9. Perspectivas

La información obtenida en este trabajo tiene un amplio margen de crecimiento, ampliando el conocimiento tanto de los receptores como de la enzima, las posibilidades son tan bastas como la imaginación lo permita. A continuación, se hace un listado de las principales perspectivas para el futuro de este trabajo.

- Realizar un diseño de fármacos racional, utilizando técnicas como el acoplamiento molecular, reemplazos isostéricos y dinámica molecular, para obtener moléculas con un perfil farmacológico deseado (antagonistas a los receptores a quimiocinas o activadores alostéricos de la TYR).
- Utilizar las estructuras de TYR-inactiva y activa para realizar un estudio de química cuántica y observar cómo los activadores alostéricos influyen en el proceso enzimático de la oxidación de la L-tirosina.
- Optimizar las estructuras activas para mejorar las características fisicoquímicas y farmacológicas de las moléculas diseñadas.
- Sintetizar las moléculas diseñadas y evaluarlas en modelos biológicos.

Article

# 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

Giovanny Aguilera-Durán <sup>1,2</sup> and Antonio Romo-Mancillas <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Querétaro 76010, Mexico; giovanny.aguilera@uaq.mx

<sup>2</sup> Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro 76010, Mexico

\* Correspondence: ruben.romo@uaq.mx

Received: 31 August 2020; Accepted: 23 September 2020; Published: 25 September 2020



**Abstract:** Vitiligo is a hypopigmentary skin pathology resulting from the death of melanocytes due to the activity of CD8<sup>+</sup> cytotoxic lymphocytes and overexpression of chemokines. These include CXCL9, CXCL10, and CXCL11 and its receptor CXCR3, both in peripheral cells of the immune system and in the skin of patients diagnosed with vitiligo. The three-dimensional structure of CXCR3 and CXCL9 has not been reported experimentally; thus, homology modeling and molecular dynamics could be useful for the study of this chemotaxis-promoter axis. In this work, a homology model of CXCR3 and CXCL9 and the structure of the CXCR3/G $\alpha_{i0}$  $\beta\gamma$  complex with post-translational modifications of CXCR3 are reported for the study of the interaction of chemokines with CXCR3 through all-atom (AA-MD) and coarse-grained molecular dynamics (CG-MD) simulations. AA-MD and CG-MD simulations showed the first activation step of the CXCR3 receptor with all chemokines and the second activation step in the CXCR3-CXCL10 complex through a decrease in the distance between the chemokine and the transmembrane region of CXCR3 and the separation of the  $\beta\gamma$  complex from the  $\alpha$  subunit in the G-protein. Additionally, a general protein–ligand interaction model was calculated, based on known antagonists binding to CXCR3. These results contribute to understanding the activation mechanism of CXCR3 and the design of new molecules that inhibit chemokine binding or antagonize the receptor, provoking a decrease of chemotaxis caused by the CXCR3/chemokines axis.

**Keywords:** CXCR3; CXCL9; CXCL10; CXCL11; protein homology modeling; molecular dynamics

## 1. Introduction

Vitiligo is a hypopigmentary skin autoimmune pathology characterized by the development of lesions lacking melanin, which is the natural pigment of the skin produced by melanocytes. Vitiligo affects 0.5–2% of the global population, with the highest incidence rates occurring in India, Japan, and Mexico [1–3]. This pathology can be classified as either nonsegmental, due to the symmetrical arrangement of the lesions, or segmental, due to the nonsymmetrical disposition of the lesions [4]. Vitiligo is not a fatal pathology; however, the patient's quality of life is drastically diminished due to social reasons such as discrimination, social isolation, and depression [5–9]. Current treatments for vitiligo are focused on the promotion of repigmentation through the stimulation of melanogenesis and decreased immune system activity and oxidative stress. Unfortunately, these treatments are

Article

# 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

Giovanny Aguilera-Durán <sup>1,2</sup> and Antonio Romo-Mancillas <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Querétaro 76010, Mexico; giovanny.aguilera@uaq.mx

<sup>2</sup> Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro 76010, Mexico

\* Correspondence: ruben.romo@uaq.mx



Citation: 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, 346. <https://doi.org/10.3390/life11040346>

Academic Editor: Andrea Catto

Received: 1 April 2021  
Accepted: 13 April 2021  
Published: 15 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The CXCR6-CXCL16 axis is involved in several pathological processes, and its overexpression has been detected in different types of cancer, such as prostate, breast, ovary, and lung cancer, along with schwannomas, in which it promotes invasion and metastasis. Moreover, this axis is involved in atherosclerosis, type 1 diabetes, primary immune thrombocytopenia, vitiligo, and other autoimmune diseases, in which it is responsible for the infiltration of different immune system cells. The 3D structure of CXCR6 and CXCL16 has not been experimentally resolved; therefore, homology modeling and molecular dynamics simulations could be useful for the study of this signaling axis. In this work, a homology model of CXCR6 and a soluble form of CXCL16 (CXCR6-CXCL16s) are reported to study the interactions between CXCR6 and CXCL16s through coarse-grained molecular dynamics (CG-MD) simulations. CG-MD simulations showed the two activation steps of CXCR6 through a decrease in the distance between the chemokine and the transmembrane region (TM) of CXCR6 and transmembrane rotational changes and polar interactions between transmembrane segments. The polar interactions between TM3, TM5, and TM6 are fundamental to functional conformation and the meta-active state of CXCR6. The interactions between D77-R280 and Y243-TM7 could be related to the functional conformation of CXCR6; alternatively, the interaction between Q195-Q244 and N248 could be related to an inactive state due to the loss of this interaction, and an arginine cage broken in the presence of CXCL16s allows the meta-active state of CXCR6. A general protein-ligand interaction supports the relevance of TM3-TM5-TM6 interactions, presenting three relevant pharmacophoric features: HAc (H-bond acceptor), HDn (H-bond donor), and Hph (hydrophobic), distributed around the space between extracellular loops (ECLs) and TMs. The HDn feature is close to TM3 and TM6; likewise, the HAc and Hph features are close to ECL1 and ECL2 and could block the rotation and interactions between TM3-TM6 and the interactions of CXCL16s with the ECLs. Tridimensional quantitative structure-activity relationships (3D-QSAR) models show that the positive steric (*V*dW) and electrostatic fields coincide with the steric and positive electrostatic region of the *exo*-azabicyclo[3.3.1]nonane scaffold in the best pIC50 ligands. This substructure is close to the E274 residue and therefore relevant to the activity of CXCR6. These data could help with the design of new molecules that inhibit chemokine binding or antagonize the receptor based on the activation mechanism of CXCR6 and provoke a decrease in chemotaxis caused by the CXCR6-CXCL16 axis.

**Keywords:** CXCR6; CXCL16s; CG-MD simulations; docking; 3D-QSAR

## 1. Introduction

The migration of immune system cells, or chemotaxis, to maturation tissues and sites of injury is controlled by small proteins (8–14 kDa) called chemokines [1,2]. About

## 10. Bibliografía

1. Ezzedine, K.; Lim, H.W.; Suzuki, T.; Katayama, I.; Hamzavi, I.; Lan, C.C.E.; Goh, B.K.; Anbar, T.; Silva de Castro, C.; Lee, A.Y.; et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2012**, *25*, E1–E13, doi:10.1111/j.1755-148X.2012.00997.x.
2. Krüger, C.; Schallreuter, K.U. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. *Int. J. Dermatol.* **2012**, *51*, 1206–1212, doi:10.1111/j.1365-4632.2011.05377.x.
3. Qiao, Z.; Wang, X.; Xiang, L.; Zhang, C. Dysfunction of Autophagy: A Possible Mechanism Involved in the Pathogenesis of Vitiligo by Breaking the Redox Balance of Melanocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–7, doi:10.1155/2016/3401570.
4. 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*, 4413, doi:10.3390/molecules25194413.
5. Fernández-Hernández, N.; Pérez-Davison, G.; Martínez-Sánchez, G. Vitiligo: Actualización Bibliográfica. *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, *27*, 938–945.
6. Spritz, R.A. The Genetics of Vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **2011**, *131*, E18–E20, doi:10.1038/skinbio.2011.7.
7. Picardo, M.; Dell'Anna, M.L.; Ezzedine, K.; Hamzavi, I.; Harris, J.E.; Parsad, D.; Taieb, A. Vitiligo. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 15011, doi:10.1038/nrdp.2015.11.
8. Huggins, R.H.; Schwartz, R.A.; Janniger, C.K. Vitiligo. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Adriat.* **2005**, *14*, 137–42, 144–5.
9. Quan, C.; Ren, Y.-Q.; Xiang, L.-H.; Sun, L.-D.; Xu, A.-E.; Gao, X.-H.; Chen, H.-D.; Pu, X.-M.; Wu, R.-N.; Liang, C.-Z.; et al. Genome-wide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and the MHC. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 614–618, doi:10.1038/ng.603.
10. Salinas-Santander, M.; Sánchez-Domínguez, C.; Cantú-Salinas, C.; Ocampo-Garza, J.; Cerda-Flores, R.; Ortiz-López, R.; Ocampo-Candiani, J. Vitiligo: Factores asociados con su aparición en pacientes del noreste de México. *Dermatología Rev. Mex.* **2014**, *58*, 232–238.
11. van Geel, N.; Speeckaert, R.; Taieb, A.; Picardo, M.; Böhm, M.; Gawkrödger, D.J.; Schallreuter, K.; Bennett, D.C.; van der Veen, W.; Whitton, M.; et al. Koebner's phenomenon in vitiligo: European position paper. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2011**, *24*, 564–573, doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00838.x.
12. Gauthier, Y.; Cario-Andre, M.; Lepreux, S.; Pain, C.; Taieb, A. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *148*, 95–101, doi:10.1046/j.1365-2133.2003.05024.x.
13. Cavalli, G.; Hayashi, M.; Jin, Y.; Yorgov, D.; Santorico, S.A.; Holcomb, C.; Rastrou, M.; Erlich,

- H.; Tengesdal, I.W.; Dagna, L.; et al. MHC class II super-enhancer increases surface expression of HLA-DR and HLA-DQ and affects cytokine production in autoimmune vitiligo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 1363–1368, doi:10.1073/pnas.1523482113.
14. Laddha, N.C.; Dwivedi, M.; Mansuri, M.S.; Gani, A.R.; Ansarullah, M.; Ramachandran, A. V.; Dalai, S.; Begum, R. Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. *Exp. Dermatol.* **2013**, *22*, 245–250, doi:10.1111/exd.12103.
  15. Xie, H.; Zhou, F.; Liu, L.; Zhu, G.; Li, Q.; Li, C.; Gao, T. Vitiligo: How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity? *J. Dermatol. Sci.* **2016**, *81*, 3–9, doi:10.1016/j.jdermsci.2015.09.003.
  16. Jimbow, K.; Chen, H.; Park, J.-S.; Thomas, P.D. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **2001**, *144*, 55–65, doi:10.1046/j.1365-2133.2001.03952.x.
  17. Jadali, Z.; Eslami, M.B.; Sanati, M.H.; Mansouri, P.; Mahmoudi, M.; Maghsoudi, . N.; Esfahanian, F. Identification of peptides specific for antibodies in vitiligo using a phage library. *Clin. Exp. Dermatol.* **2005**, *30*, 694–701, doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01903.x.
  18. Waterman, E.A.; Gawkrödger, D.J.; Watson, P.F.; Weetman, A.P.; Helen Kemp, E. Autoantigens in Vitiligo Identified by the Serological Selection of a Phage-Displayed Melanocyte cDNA Expression Library. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 230–240, doi:10.1038/jid.2009.207.
  19. Li, Y.L.; Yu, C.L.; Yu, H.S. IgG anti-melanocyte antibodies purified from patients with active vitiligo induce HLA-DR and intercellular adhesion molecule-1 expression and an increase in interleukin-8 release by melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115*, 969–973, doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00130.x.
  20. Rahoma, S.F.E.; Sandhu, H.K.; McDonagh, A.J.G.; Gawkrödger, D.J.; Weetman, A.P.; Kemp, E.H. Epitopes, avidity and IgG subclasses of tyrosine hydroxylase autoantibodies in vitiligo and alopecia areata patients. *Br. J. Dermatol.* **2012**, *167*, 17–28, doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10889.x.
  21. Kemp, H.E.; Waterman, E.A.; Gawkrödger, D.J.; Watson, P.F.; Weetman, A.P. Identification of epitopes on tyrosinase which are recognized by autoantibodies from patients with vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **1999**, *113*, 267–271, doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00664.x.
  22. Blomhoff, A.; Helen Kemp, E.; Gawkrödger, D.J.; Weetman, A.P.; Husebye, E.S.; Akselsen, H.E.; Lie, B.A.; Undlien, D.E. CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases. *Pigment Cell Res.* **2005**, *18*, 55–58, doi:10.1111/j.1600-0749.2004.00196.x.
  23. van den Boorn, J.G.; Konijnenberg, D.; DelleMijn, T.A.M.; Wietze van der Veen, J.P.; Bos, J.D.; Melief, C.J.M.; Vyth-Dreese, F.A.; Luiten, R.M. Autoimmune Destruction of Skin Melanocytes by Perilesional T Cells from Vitiligo Patients. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *129*, 2220–2232, doi:10.1038/jid.2009.32.

24. Sisti, A.; Sisti, G.; Oranges, C.M. Effectiveness and safety of topical tacrolimus monotherapy for repigmentation in vitiligo: A comprehensive literature review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91*, 187–195, doi:10.1590/abd1806-4841.20164012.
25. 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.; et al. CXCL10 Is Critical for the Progression and Maintenance of Depigmentation in a Mouse Model of Vitiligo. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 223ra23-223ra23, doi:10.1126/scitranslmed.3007811.
26. Call, M.E.; Wucherpfennig, K.W. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor–CD3 complex. *Mol. Immunol.* **2004**, *40*, 1295–1305, doi:10.1016/j.molimm.2003.11.017.
27. Ma, Y.; Lim, Y.J.; Benda, A.; Lou, J.; Goyette, J.; Gaus, K. Clustering of the  $\zeta$ -Chain Can Initiate T Cell Receptor Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3498, doi:10.3390/ijms21103498.
28. Alba, J.; Di Rienzo, L.; Milanetti, E.; Acuto, O.; D'Abramo, M. Molecular Dynamics Simulations Reveal Canonical Conformations in Different pMHC/TCR Interactions. *Cells* **2020**, *9*, 942, doi:10.3390/cells9040942.
29. García-Mariscal, A.; del Blanco, B.; Hernández-Munain, C. Generación de diversidad de los receptores de antígeno en linfocitos: validación del «modelo de accesibilidad» en el control de la recombinación V(D)J. *Inmunología* **2013**, *32*, 57–69, doi:10.1016/j.inmuno.2012.07.003.
30. Müller, M.; Carter, S.; Hofer, M.J.; Campbell, I.L. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity - a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2010**, *36*, 368–387, doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01089.x.
31. Yang, L.; Yang, S.; Lei, J.; Hu, W.; Chen, R.; Lin, F.; Xu, A. Role of chemokines and the corresponding receptors in vitiligo: A pilot study. *J. Dermatol.* **2018**, *45*, 31–38, doi:10.1111/1346-8138.14004.
32. 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*, 1318–1326, doi:10.1111/bjd.14416.
33. Hao, Y.; Li, Y.; Li, H.; Lyu, M.; Zhang, D.; Fu, R.; Guan, Y.; Wang, S.; Sun, B.; Dou, X.; et al. Increased plasma sCXCL16 levels may have a relationship with Th1/Th2 imbalance in primary immune thrombocytopenia. *Cytokine* **2017**, *99*, 124–131, doi:10.1016/j.cyto.2017.08.024.
34. Wang, Y.; Li, S.; Li, C. Perspectives of New Advances in the Pathogenesis of Vitiligo: From Oxidative Stress to Autoimmunity. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 1017–1023, doi:10.12659/MSM.914898.
35. Petit, S.J.; Chayen, N.E.; Pease, J.E. Site-directed mutagenesis of the chemokine receptor CXCR6 suggests a novel paradigm for interactions with the ligand CXCL16. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 2337–2350, doi:10.1002/eji.200838269.
36. Peddibhotla, S.; Hershberger, P.M.; Jason Kirby, R.; Sugarman, E.; Maloney, P.R.; Hampton

- Sessions, E.; Divlianska, D.; Morfa, C.J.; Terry, D.; Pinkerton, A.B.; et al. Discovery of small molecule antagonists of chemokine receptor CXCR6 that arrest tumor growth in SK-HEP-1 mouse xenografts as a model of hepatocellular carcinoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 126899, doi:10.1016/j.bmcl.2019.126899.
37. Van Raemdonck, K.; Van den Steen, P.E.; Liekens, S.; Van Damme, J.; Struyf, S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2015**, *26*, 311–327, doi:10.1016/j.cytogfr.2014.11.009.
38. 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. *Mol. Pharmacol.* **2017**, *92*, 136–150, doi:10.1124/mol.117.108522.
39. 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. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, doi:10.3389/fimmu.2017.01970.
40. Brinkman, C.C.; Peske, J.D.; Engelhard, V.H. Peripheral Tissue Homing Receptor Control of Naïve, Effector, and Memory CD8 T Cell Localization in Lymphoid and Non-Lymphoid Tissues. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 1–8, doi:10.3389/fimmu.2013.00241.
41. Palladino, P.; Portella, L.; Colonna, G.; Raucci, R.; Saviano, G.; Rossi, F.; Napolitano, M.; Scala, S.; Castello, G.; Costantini, S. The N-terminal Region of CXCL11 as Structural Template for CXCR3 Molecular Recognition: Synthesis, Conformational Analysis, and Binding Studies. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *80*, 254–265, doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01397.x.
42. Groom, J.R.; Luster, A.D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* **2011**, *89*, 207–215, doi:10.1038/icb.2010.158.
43. 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*, 10418–10425, doi:10.1021/bi026020q.
44. Benredjem, B.; Girard, M.; Rhainds, D.; St-Onge, G.; Heveker, N. Mutational Analysis of Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3/CXCR7) Interaction with Its Chemokine Ligands CXCL11 and CXCL12. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 31–42, doi:10.1074/jbc.M116.762252.
45. Sanchez, J.; e Huma, Z.; Lane, J.R.; Liu, X.; Bridgford, J.L.; Payne, R.J.; Canals, M.; Stone, M.J. Evaluation and extension of the two-site, two-step model for binding and activation of the chemokine receptor CCR1. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 3464–3475, doi:10.1074/jbc.RA118.006535.
46. Clark-Lewis, I.; Mattioli, I.; Gong, J.-H.; Loetscher, P. Structure-Function Relationship between the Human Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligands. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 289–295, doi:10.1074/jbc.M209470200.
47. Ngo, T.; Stephens, B.S.; Gustavsson, M.; Holden, L.G.; Abagyan, R.; Handel, T.M.; Kufareva, I. Crosslinking-guided geometry of a complete CXC receptor-chemokine complex and the

- basis of chemokine subfamily selectivity. *PLOS Biol.* **2020**, *18*, e3000656, doi:10.1371/journal.pbio.3000656.
48. Trotta, T.; Costantini, S.; Colonna, G. Modelling of the membrane receptor CXCR3 and its complexes with CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines: Putative target for new drug design. *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 332–339, doi:10.1016/j.molimm.2009.09.013.
  49. Schmidt, D.; Bernat, V.; Brox, R.; Tschammer, N.; Kolb, P. Identifying modulators of CXCR3 receptors 3 and 4 with tailored selectivity using multi-target docking. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 715–724, doi:10.1021/cb500577j.
  50. Scholten, D.J.; Roumen, L.; Wijtmans, M.; Verkade-Vreeker, M.C.A.; Custers, H.; Lai, M.; de Hooge, D.; Canals, M.; de Esch, I.J.P.; Smit, M.J.; et al. Identification of Overlapping but Differential Binding Sites for the High-Affinity CXCR3 Antagonists NBI-74330 and VUF11211. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *85*, 116–126, doi:10.1124/mol.113.088633.
  51. 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*, 5838–5849, doi:10.1128/MCB.00556-06.
  52. Okada, T.; Ernst, O.P.; Palczewski, K.; Hofmann, K.P. Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 318–324, doi:10.1016/S0968-0004(01)01799-6.
  53. Hofmann, K.P.; Scheerer, P.; Hildebrand, P.W.; Choe, H.-W.; Park, J.H.; Heck, M.; Ernst, O.P. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 540–552, doi:10.1016/j.tibs.2009.07.005.
  54. Deupi, X. Relevance of rhodopsin studies for GPCR activation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, *1837*, 674–682, doi:10.1016/j.bbabbio.2013.09.002.
  55. Singh, S.P.; Foley, J.F.; Zhang, H.H.; Hurt, D.E.; Richards, J.L.; Smith, C.S.; Liao, F.; Farber, J.M. Selectivity in the Use of G i/o Proteins Is Determined by the DRF Motif in CXCR6 and Is Cell-Type Specific. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *88*, 894–910, doi:10.1124/mol.115.099960.
  56. Woods, K.N.; Pfeffer, J.; Dutta, A.; Klein-Seetharaman, J. Vibrational resonance, allostery, and activation in rhodopsin-like G protein-coupled receptors. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37290, doi:10.1038/srep37290.
  57. Gao, Y.; Hu, H.; Ramachandran, S.; Erickson, J.W.; Cerione, R.A.; Skiniotis, G. Structures of the Rhodopsin-Transducin Complex: Insights into G-Protein Activation. *Mol. Cell* **2019**, *75*, 781-790.e3, doi:10.1016/j.molcel.2019.06.007.
  58. Neumann, A.; Engel, V.; Mahardhika, A.B.; Schoeder, C.T.; Namasivayam, V.; Kieć-Kononowicz, K.; Müller, C.E. Computational Investigations on the Binding Mode of Ligands for the Cannabinoid-Activated G Protein-Coupled Receptor GPR18. *Biomolecules* **2020**, *10*, 686, doi:10.3390/biom10050686.
  59. Cole, A.G.; Stroke, I.L.; Brescia, M.-R.; Simhadri, S.; Zhang, J.J.; Hussain, Z.; Snider, M.; Haskell, C.; Ribeiro, S.; Appell, K.C.; et al. Identification and initial evaluation of 4-N-aryl-

- [1,4]diazepane ureas as potent CXCR3 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 200–203, doi:10.1016/j.bmcl.2005.09.020.
60. Watson, R.J.; Allen, D.R.; Birch, H.L.; Chapman, G.A.; Galvin, F.C.; Jopling, L.A.; Knight, R.L.; Meier, D.; Oliver, K.; Meissner, J.W.G.; et al. Development of CXCR3 antagonists. Part 3: Tropanyl and homotropanyl-piperidine urea derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 147–151, doi:10.1016/j.bmcl.2007.10.109.
61. Bongartz, J.-P.; Buntinx, M.; Coesemans, E.; Hermans, B.; Lommen, G. Van; Wauwe, J. Van Synthesis and structure–activity relationship of benzetimide derivatives as human CXCR3 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5819–5823, doi:10.1016/j.bmcl.2008.07.115.
62. Allen, D.R.; Bolt, A.; Chapman, G.A.; Knight, R.L.; Meissner, J.W.G.; Owen, D.A.; Watson, R.J. Identification and structure–activity relationships of 1-aryl-3-piperidin-4-yl-urea derivatives as CXCR3 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 697–701, doi:10.1016/j.bmcl.2006.10.088.
63. Du, X.; Gustin, D.J.; Chen, X.; Duquette, J.; McGee, L.R.; Wang, Z.; Ebsworth, K.; Henne, K.; Lemon, B.; Ma, J.; et al. Imidazo-pyrazine derivatives as potent CXCR3 antagonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5200–5204, doi:10.1016/j.bmcl.2009.07.021.
64. McGuinness, B.F.; Carroll, C.D.; Zawacki, L.G.; Dong, G.; Yang, C.; Hobbs, D.W.; Jacob-Samuel, B.; Hall, J.W.; Jenh, C.-H.; Kozlowski, J.A.; et al. Novel CXCR3 antagonists with a piperazinyl-piperidine core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5205–5208, doi:10.1016/j.bmcl.2009.07.020.
65. Crosignani, S.; Missotten, M.; Cleva, C.; Dondi, R.; Ratinaud, Y.; Humbert, Y.; Mandal, A.B.; Bombrun, A.; Power, C.; Chollet, A.; et al. Discovery of a novel series of CXCR3 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3614–3617, doi:10.1016/j.bmcl.2010.04.113.
66. Shao, Y.; Anilkumar, G.N.; Carroll, C.D.; Dong, G.; Hall, J.W.; Hobbs, D.W.; Jiang, Y.; Jenh, C.-H.; Kim, S.H.; Kozlowski, J.A.; et al. II. SAR studies of pyridyl–piperazinyl-piperidine derivatives as CXCR3 chemokine antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1527–1531, doi:10.1016/j.bmcl.2010.12.114.
67. Wijtmans, M.; Verzijl, D.; Bergmans, S.; Lai, M.; Bosch, L.; Smit, M.J.; de Esch, I.J.P.; Leurs, R. CXCR3 antagonists: Quaternary ammonium salts equipped with biphenyl- and polycycloaliphatic-anchors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3384–3393, doi:10.1016/j.bmc.2011.04.035.
68. Thoma, G.; Baenteli, R.; Lewis, I.; Jones, D.; Kovarik, J.; Streiff, M.B.; Zerwes, H.-G. Special ergolines efficiently inhibit the chemokine receptor CXCR3 in blood. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4745–4749, doi:10.1016/j.bmcl.2011.06.070.
69. Sterling, T.; Irwin, J.J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 2324–2337, doi:10.1021/acs.jcim.5b00559.
70. Huang, D.; Gu, Q.; Ge, H.; Ye, J.; Salam, N.K.; Hagler, A.; Chen, H.; Xu, J. On the Value of Homology Models for Virtual Screening: Discovering hCXCR3 Antagonists by

- Pharmacophore-Based and Structure-Based Approaches. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1356–1366, doi:10.1021/ci300067q.
71. Deng, H.; Unutmaz, D.; KewalRamani, V.N.; Littman, D.R. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **1997**, *388*, 296–300, doi:10.1038/40894.
  72. Loetscher, M.; Amara, A.; Oberlin, E.; Brass, N.; Legler, D.F.; Loetscher, P.; D'Apuzzo, M.; Meese, E.; Rousset, D.; Virelizier, J.L.; et al. TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function. *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 652–660, doi:10.1016/S0960-9822(06)00292-2.
  73. Koenen, A.; Babendreyer, A.; Schumacher, J.; Pasqualon, T.; Schwarz, N.; Seifert, A.; Deupi, X.; Ludwig, A.; Drey Mueller, D. The DRF motif of CXCR6 as chemokine receptor adaptation to adhesion. *PLoS One* **2017**, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0173486.
  74. Liu, W.; Yin, L.; Dai, Y. Modification of SR-PSOX functions by multi-point mutations of basic amino acid residues. *Biochimie* **2013**, *95*, 224–230, doi:10.1016/j.biochi.2012.09.016.
  75. Consortium, T.U. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D158–D169, doi:10.1093/nar/gkw1099.
  76. Scholz, F.; Schulte, A.; Adamski, F.; Hundhausen, C.; Mittag, J.; Schwarz, A.; Kruse, M.L.; Proksch, E.; Ludwig, A. Constitutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 1444–1455, doi:10.1038/sj.jid.5700751.
  77. Ludwig, A.; Hundhausen, C.; Lambert, M.; Broadway, N.; Andrews, R.; Bickett, D.; Leesnitzer, M.; Becherer, J. Metalloproteinase Inhibitors for the Disintegrin-Like Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that Differentially Block Constitutive and Phorbol Ester-Inducible Shedding of Cell Surface Molecules. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2005**, *8*, 161–171, doi:10.2174/1386207053258488.
  78. Reiss, K.; Ludwig, A.; Saftig, P. Breaking up the tie: Disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *111*, 985–1006, doi:10.1016/j.pharmthera.2006.02.009.
  79. Ludwig, A.; Weber, C. Transmembrane chemokines: versatile “special agents” in vascular inflammation. *Thromb. Haemost.* **2007**, *97*, 694–703, doi:10.1160/TH07.
  80. Gough, P.J.; Garton, K.J.; Wille, P.T.; Rychlewski, M.; Dempsey, P.J.; Raines, E.W. A Disintegrin and Metalloproteinase 10-Mediated Cleavage and Shedding Regulates the Cell Surface Expression of CXC Chemokine Ligand 16. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 3678–3685, doi:10.4049/jimmunol.172.6.3678.
  81. Gooden, M.J.M.; Wiersma, V.R.; Boerma, A.; Leffers, N.; Boezen, H.M.; Ten Hoor, K.A.; Hollema, H.; Walenkamp, A.M.E.; Daemen, T.; Nijman, H.W.; et al. Elevated serum CXCL16 is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer and may reflect pro-metastatic ADAM protease activity. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 1535–1544, doi:10.1038/bjc.2014.55.

82. Hu, W.; Liu, Y.; Zhou, W.; Si, L.; Ren, L. CXCL16 and CXCR6 are coexpressed in human lung cancer In Vivo and mediate the invasion of lung cancer cell lines In Vitro. *PLoS One* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0099056.
83. Li, J.; Ley, K. Lymphocyte Migration Into Atherosclerotic Plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 40–49, doi:10.1161/ATVBAHA.114.303227.
84. Wang, C.; Li, Q.; Zhen, J.; Xu, Y.; Sun, S. Simvastatin ameliorates renal lipidosis through the suppression of renal CXCL16 expression in mice with adriamycin-induced nephropathy. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 15696–707.
85. Xiao, G.; Wang, X.; Wang, J.; Zu, L.; Cheng, G.; Hao, M.; Sun, X.; Xue, Y.; Lu, J.; Wang, J. CXCL16/CXCR6 chemokine signaling mediates breast cancer progression by pERK1/2-dependent mechanisms. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14165–14178, doi:10.18632/oncotarget.3690.
86. Fallahi, P.; Corrado, A.; Di Domenicantonio, A.; Frenzilli, G.; Antonelli, A.; Martina Ferrari, S. CXCR3, CXCR5, CXCR6, and CXCR7 in Diabetes. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 515–519, doi:10.2174/1389450115666141229153949.
87. Elmaci, İ.; Altinoz, M.; Sari, R. Immune Pathobiology of Schwannomas: A Concise Review. *J. Neurol. Surg. Part A Cent. Eur. Neurosurg.* **2018**, *79*, 159–162, doi:10.1055/s-0037-1603949.
88. Wasilko, D.J.; Johnson, Z.L.; Ammirati, M.; Che, Y.; Griffor, M.C.; Han, S.; Wu, H. Structural basis for chemokine receptor CCR6 activation by the endogenous protein ligand CCL20. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3031, doi:10.1038/s41467-020-16820-6.
89. Lee, E.Y.; Lee, Z.H.; Song, Y.W. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **2009**, *8*, 379–383, doi:10.1016/j.autrev.2008.12.002.
90. Li, S.; Zhu, G.; Yang, Y.; Jian, Z.; Guo, S.; Dai, W.; Shi, Q.; Ge, R.; Ma, J.; Liu, L.; et al. 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*, 177–189.e9, doi:10.1016/j.jaci.2016.10.013.
91. Park, H.Y.; Kosmadaki, M.; Yaar, M.; Gilcrest, B.A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1493–1506, doi:10.1007/s00018-009-8703-8.
92. Wrześniok, D.; Beberok, A.; Otreba, M.; Buszman, E. Netilmicin-induced modulation of melanogenesis in HEMa-LP melanocytes. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2013**, *70*, 803–808.
93. Cichorek, M.; Wachulska, M.; Stasiewicz, A.; Tymińska, A. Skin melanocytes: biology and development. *Adv. Dermatology Allergol.* **2013**, *1*, 30–41, doi:10.5114/pdia.2013.33376.
94. Costin, G.-E.; Hearing, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **2007**, *21*, 976–994, doi:10.1096/fj.06-6649rev.
95. Videira, I.F.D.S.; Moura, D.F.L.; Magina, S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An. Bras. Dermatol.* **2013**, *88*, 76–83, doi:10.1590/S0365-05962013000100009.
96. Ando, H.; Niki, Y.; Yoshida, M.; Ito, M.; Akiyama, K.; Kim, J.-H.; Yoon, T.-J.; Matsui, M.S.; Yarosh, D.B.; Ichihashi, M. Involvement of pigment globules containing multiple melanosomes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. *Cell. Logist.* **2011**, *1*, 12–

- 20, doi:10.4161/cl.1.1.13638.
97. Slominski, A.; Plonka, P.M.; Pisarchik, A.; Smart, J.L.; Tolle, V.; Wortsman, J.; Low, M.J. Preservation of Eumelanin Hair Pigmentation in Proopiomelanocortin-Deficient Mice on a Nonagouti (a/a) Genetic Background. *Endocrinology* **2005**, *146*, 1245–1253, doi:10.1210/en.2004-0733.
  98. Yamaguchi, Y.; Hearing, V.J.; Manuscript, A. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* **2010**, *35*, 193–199, doi:10.1002/biof.29.Physiological.
  99. Du, J.; Miller, A.J.; Widlund, H.R.; Horstmann, M.A.; Ramaswamy, S.; Fisher, D.E. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 333–343, doi:10.1016/S0002-9440(10)63657-7.
  100. Thornton, M.J. Estrogens and aging skin. *Dermatoendocrinol.* **2013**, *5*, 264–270, doi:10.4161/derm.23872.
  101. Magina, S.; Esteves-Pinto, C.; Moura, E.; Serrão, M.P.; Moura, D.; Petrosino, S.; Di Marzo, V.; Vieira-Coelho, M.A. Inhibition of basal and ultraviolet B-induced melanogenesis by cannabinoid CB1 receptors: A keratinocyte-dependent effect. *Arch. Dermatol. Res.* **2011**, *303*, 201–210, doi:10.1007/s00403-011-1126-z.
  102. Lin, J.Y.; Fisher, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **2007**, *445*, 843–850, doi:10.1038/nature05660.
  103. Favre, E.; Daina, A.; Carrupt, P.A.; Nurisso, A. Modeling the met form of human tyrosinase: A refined and hydrated pocket for antagonist design. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *84*, 206–215, doi:10.1111/cbdd.12306.
  104. Niu, C.; Pang, G.X.; Li, G.; Dou, J.; Nie, L.F.; Himitt, H.; Kabas, M.; Aisa, H.A. Synthesis and biological evaluation of furocoumarin derivatives on melanin synthesis in murine B16 cells for the treatment of vitiligo. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24*, 5960–5968, doi:10.1016/j.bmc.2016.09.056.
  105. Niu, C.; Tuerxuntayi, A.; Li, G.; Kabas, M.; Dong, C.Z.; Aisa, H.A. Design, synthesis and bioactivity of chalcones and its analogues. *Chinese Chem. Lett.* **2017**, *28*, 1533–1538, doi:10.1016/j.ccllet.2017.03.018.
  106. Sonmez, F.; Sevmezler, S.; Atahan, A.; Ceylan, M.; Demir, D.; Gencer, N.; Arslan, O.; Kucukislamoglu, M. Evaluation of new chalcone derivatives as polyphenol oxidase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7479–7482, doi:10.1016/j.bmcl.2011.09.130.
  107. Dubois, C.; Haudecoeur, R.; Orio, M.; Belle, C.; Bochot, C.; Boumendjel, A.; Hardré, R.; Jamet, H.; Réglie, M. Versatile Effects of Aurone Structure on Mushroom Tyrosinase Activity. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 559–565, doi:10.1002/cbic.201100716.
  108. Gawehn, E.; Hiss, J.A.; Schneider, G. Deep Learning in Drug Discovery. *Mol. Inform.* **2016**, *35*, 3–14, doi:10.1002/minf.201501008.
  109. de Ruyck, J.; Brysbaert, G.; Blossey, R.; Lensink, M.F. Molecular docking as a popular tool in

- drug design, an in silico travel. *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* **2016**, *9*, 1–11, doi:10.2147/AABC.S105289.
110. Sneha, P.; George Priya Doss, C. Molecular Dynamics. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Elsevier Inc., 2016; Vol. 102, pp. 181–224 ISBN 9780128047958.
111. Floudas, C.A.; Fung, H.K.; McAllister, S.R.; Mönningmann, M.; Rajgaria, R. Advances in protein structure prediction and de novo protein design: A review. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 966–988, doi:10.1016/j.ces.2005.04.009.
112. Xu, X.; Huang, M.; Zou, X. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. *Biophys. Reports* **2018**, *4*, 1–16, doi:10.1007/s41048-017-0045-8.
113. Grinter, S.Z.; Zou, X. Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design. *Molecules* **2014**, *19*, 10150–10176, doi:10.3390/molecules190710150.
114. Hetényi, C.; van der Spoel, D. Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1447–1450, doi:10.1016/j.febslet.2006.01.074.
115. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791, doi:10.1002/jcc.21256.
116. Mitsutake, A.; Nagai, T.; Takano, H. Relaxation mode analysis for simulations of biomolecules. **2013**, *1637*, 164102, doi:10.1007/s12551-018-0406-7.
117. Dämgen, M.A.; Biggin, P.C. Computational methods to examine conformational changes and ligand-binding properties: Examples in neurobiology. *Neurosci. Lett.* **2018**, doi:10.1016/j.neulet.2018.03.004.
118. Galindo-Murillo, R.; Roe, D.R.; Cheatham, T.E. Convergence and reproducibility in molecular dynamics simulations of the DNA duplex d(GCACGAACGAACGAACGC). *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2015**, *1850*, 1041–1058, doi:10.1016/j.bbagen.2014.09.007.
119. Buitrón-González, I.; Aguilera-Durán, G.; Romo-Mancillas, A. In-silico drug repurposing study: Amprenavir, enalaprilat, and plerixafor, potential drugs for destabilizing the SARS-CoV-2 S-protein-angiotensin-converting enzyme 2 complex. *Results Chem.* **2021**, *3*, 100094, doi:10.1016/j.rechem.2020.100094.
120. Londhe, A.M.; Gadhe, C.G.; Lim, S.M.; Pae, A.N. Investigation of Molecular Details of Keap1-Nrf2 Inhibitors Using Molecular Dynamics and Umbrella Sampling Techniques. *Molecules* **2019**, *24*, 4085, doi:10.3390/molecules24224085.
121. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 1–8, doi:10.1186/1471-2105-9-40.
122. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 725–738, doi:10.1038/nprot.2010.5.
123. Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **2014**, *12*, 7–8, doi:10.1038/nmeth.3213.

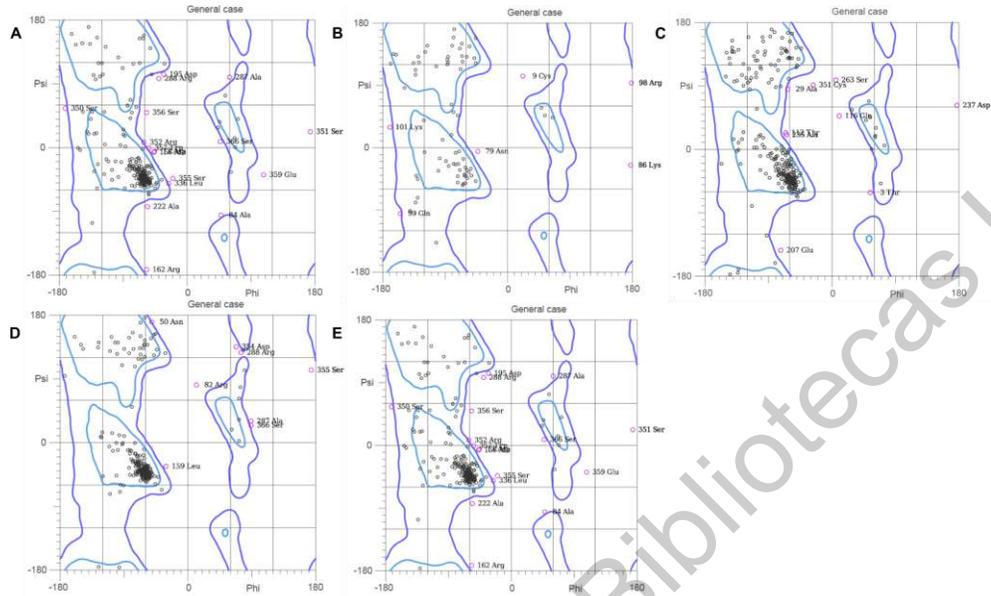
124. Zhang, J.; Yang, J.; Jang, R.; Zhang, Y. GPCR-I-TASSER: A Hybrid Approach to G Protein-Coupled Receptor Structure Modeling and the Application to the Human Genome. *Structure* **2015**, *23*, 1538–1549, doi:10.1016/j.str.2015.06.007.
125. Chen, V.B.; Arendall, W.B.; Headd, J.J.; Keedy, D.A.; Immormino, 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*, 12–21, doi:10.1107/S09074444909042073.
126. Booth, V.; Clark-Lewis, I.; Sykes, B.D. NMR structure of CXCR3 binding chemokine CXCL11 (ITAC). *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2022–2028, doi:10.1110/ps.04791404.
127. García-Nafria, J.; Nehmé, R.; Edwards, P.C.; Tate, C.G. Cryo-EM structure of the serotonin 5-HT1B receptor coupled to heterotrimeric Go. *Nature* **2018**, *558*, 620–623, doi:10.1038/s41586-018-0241-9.
128. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410, doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
129. States, D.J.; Gish, W. QGB: Combined Use of Sequence Similarity and Codon Bias for Coding Region Identification. *J. Comput. Biol.* **1994**, *1*, 39–50, doi:10.1089/cmb.1994.1.39.
130. Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V.G.; Im, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1859–1865, doi:10.1002/jcc.20945.
131. 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.; et al. 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*, 405–413, doi:10.1021/acs.jctc.5b00935.
132. Berendsen, H.J.C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43–56, doi:10.1016/0010-4655(95)00042-E.
133. Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A.E.; Berendsen, H.J.C. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–1718, doi:10.1002/jcc.20291.
134. Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101, doi:10.1063/1.2408420.
135. Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182–7190, doi:10.1063/1.328693.
136. Daura, X.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, W.F.; Mark, A.E. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, *38*, 236–240, doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19990115)38:1/2<236::AID-ANIE236>3.3.CO;2-D.
137. Bowers, K.J.; Chow, D.E.; Xu, H.; Dror, R.O.; Eastwood, M.P.; Gregersen, B.A.; Klepeis, J.L.; Kolossvary, I.; Moraes, M.A.; Sacerdoti, F.D.; et al. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. In Proceedings of the ACM/IEEE SC 2006

- Conference (SC'06); IEEE, 2006; pp. 43–43.
138. Schrödinger Release 2020-1: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2020. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2020. Maestro 2020.
  139. Schrödinger Release 2019-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019. Maestro.
  140. 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*, 4486–4494, doi:10.1021/acs.jctc.5b00513.
  141. 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*, 255–278, doi:10.1038/nprot.2016.169.
  142. Vajda, S.; Yueh, C.; Beglov, D.; Bohnuud, T.; Mottarella, S.E.; Xia, B.; Hall, D.R.; Kozakov, D. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2017**, *85*, 435–444, doi:10.1002/prot.25219.
  143. Xia, B.; Vajda, S.; Kozakov, D. Accounting for pairwise distance restraints in FFT-based protein-protein docking. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 3342–3344, doi:10.1093/bioinformatics/btw306.
  144. Santos-Martins, D.; Solis-Vasquez, L.; Tillack, A.F.; Sanner, M.F.; Koch, A.; Forli, S. Accelerating AUTODOCK4 with GPUs and Gradient-Based Local Search. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17*, 1060–1073, doi:10.1021/acs.jctc.0c01006.
  145. Koes, D.R.; Camacho, C.J. Pharmer: Efficient and Exact Pharmacophore Search. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1307–1314, doi:10.1021/ci200097m.
  146. Reynolds, A.P.; Richards, G.; de la Iglesia, B.; Rayward-Smith, V.J. Clustering Rules: A Comparison of Partitioning and Hierarchical Clustering Algorithms. *J. Math. Model. Algorithms* **2006**, *5*, 475–504, doi:10.1007/s10852-005-9022-1.
  147. Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Struyf, A.; Hubert, M.; Hornik, K. cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.1.0. Available online: <https://cran.r-project.org/package=cluster> (accessed on Aug 12, 2020).
  148. Team, R.C. R: A Language and Environment for Statistical Computing Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on Aug 12, 2020).
  149. Tosco, P.; Balle, T. Open3DQSAR: a new open-source software aimed at high-throughput chemometric analysis of molecular interaction fields. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 201–208, doi:10.1007/s00894-010-0684-x.
  150. Cramer, R.D.; Patterson, D.E.; Bunce, J.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959–5967, doi:10.1021/ja00226a005.
  151. Naceiri Mrabti, N.; Elhallaoui, M. QSAR study and molecular docking of benzimidazole derivatives as potent activators of AMP-activated protein kinase. *J. Taibah Univ. Sci.* **2017**,

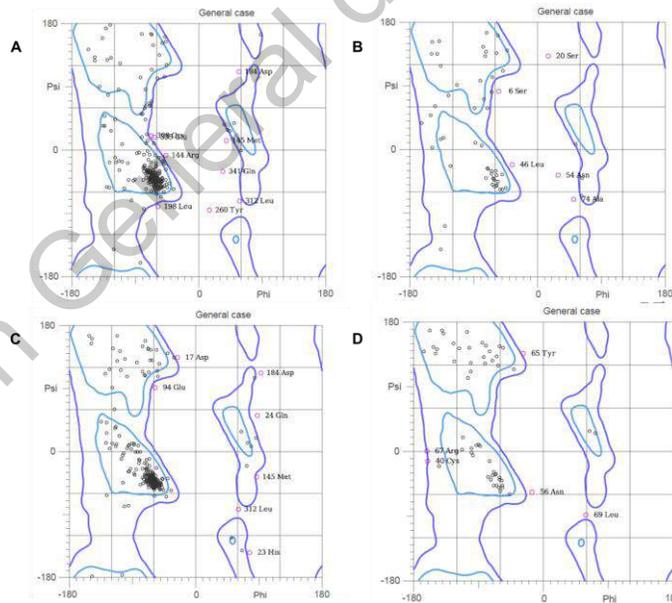
- 11, 18–39, doi:10.1016/j.jtusci.2016.05.004.
152. Niu, C.; Yin, L.; Nie, L.F.; Dou, J.; Zhao, J.Y.; Li, G.; Aisa, H.A. Synthesis and bioactivity of novel isoxazole chalcone derivatives on tyrosinase and melanin synthesis in murine B16 cells for the treatment of vitiligo. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24*, 5440–5448, doi:10.1016/j.bmc.2016.08.066.
153. Yin, L.; Niu, C.; Liao, L. xin; Dou, J.; Habasi, M.; Aisa, H.A. An isoxazole chalcone derivative enhances melanogenesis in b16 melanoma cells via the Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathways. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22122077.
154. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer-Verlag New York, 2009; ISBN 978-0-387-98140-6.
155. Schrödinger, L. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0*; 2015;
156. Jha, P.; Chaturvedi, S.; Swastika; Pal, S.; Jain, N.; Mishra, A.K. Improvising 5-HT 7 R 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*, 2475–2494, doi:10.1080/07391102.2017.1359907.
157. Becerra, E.; Aguilera-Durán, G.; Berumen, L.; Romo-Mancillas, A.; García-Alcocer, G. Study of Endogen Substrates, Drug Substrates and Inhibitors Binding Conformations on MRP4 and Its Variants by Molecular Docking and Molecular Dynamics. *Molecules* **2021**, *26*, 1051, doi:10.3390/molecules26041051.
158. The Uniprot Consortium Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D191–D198, doi:10.1093/nar/gkt1140.
159. Nedjai, B.; Viney, J.M.; Li, H.; Hull, C.; Anderson, C.A.; Horie, T.; Horuk, R.; Vaidehi, N.; Pease, J.E. CXCR3 antagonist VUF10085 binds to an intrahelical site distinct from that of the broad spectrum antagonist TAK-779. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 1822–1833, doi:10.1111/bph.13027.
160. Sivashanmugam, M.; K. N., S.; V., U. Virtual screening of natural inhibitors targeting ornithine decarboxylase with pharmacophore scaffolding of DFMO and validation by molecular dynamics simulation studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *37*, 766–780, doi:10.1080/07391102.2018.1439772.
161. 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*, 10418–10425, doi:10.1021/bi026020q.

## 11. Anexos

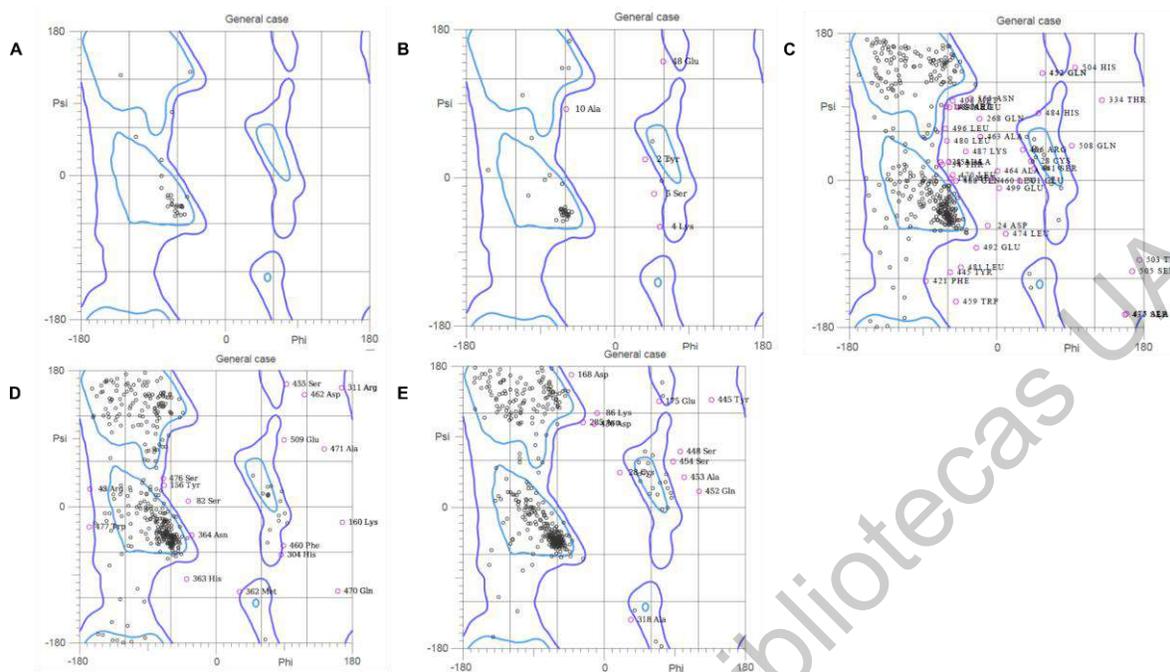
### Anexo I Diagramas de Ramachandran



Diagramas de Ramachandran CXCR3. A) CXCR3-M1, B) CXCL9-M1, C) GPα-M1, D) CXCR3-C1 y E) CXCL9-C1.



Diagramas de Ramachandran CXCR6. A) CXCR6-M1, B) CXCL16s-M1, C) CXCR6-Minimizado y D) CXCL16s-C1



**Diagramas de Ramachandran TYR.** A) TYR-Cito, B) TYR-TM, C) TYR-Mel, D) TYR-M1 y E) TYR-Zn<sup>+2</sup>-C1.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Anexo II. Interacciones de los complejos CXCR3-GP y CXCR3/quimiocinas

Interacciones entre los segmentos transmembranales de la simulación CXCR3-GP CG-MD.

0 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	Y60-S301
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	-	Y136-L218 N132-Q219	-	A127, F131-Y308
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	L256-Y318

100 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-T100	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	-	-	N132-Y271	A127-S304
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

200 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	Y136-L218	-	I145, R149-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

300 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	-	Y136-L218 S146-P227, Y235	N132-Y271	A127-S304 S146-Y318 R149-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	R216-V275	-
TM6	-	-	-	-	-	-	Y271-K300 A263-N314

400 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	-	Y136-L218	G128, N132-Y271	L130-Y308 I145-Y318
TM4	-	-	-	-	-	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	L220-H272	Q219-K300 Y235-Y318

TM6	-	-	-	-	-	-	-	Y271-K300 V260-N314
-----	---	---	---	---	---	---	---	------------------------

500 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-F186, D186	S146, Y150-Y235 Y136-L218	G128, N132-Y271	L130-S304 N134-Y308 I145, R149-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

600 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	N71-C312
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	-	Y136-L218	F131-Y271	A127-S304
TM4	-	-	-	-	-	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	-	Q219-K300
TM6	-	-	-	-	-	-	-

700 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99- N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	-	N132-Q219 Y136-L218 Y150-C234	A126-Y271	A126-S304 R149-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	A263-N314

800 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99- N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132- F182	Y136-L218	-	A126-S304 N134-Y308
TM4	-	-	-	-	-	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	R216-V275 Q219-Y271	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

900 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	N71-C312
TM2	-	-	D99- N134	-	-	-	D99-Y308

TM3	-	-	-	-	N132-F181	N132-Q219 R149-Y235	N134-Y308 R149-V231
TM4	-	-	-	-	-	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	Q219-Y271	-
TM6	-	-	-	-	-	-	A263-H310

1000 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99- N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	-	-	-	A126-S304 L130-Y308 M145-Y318 R149-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	D186-K300
TM5	-	-	-	-	-	Q219-Y271 L220-H272	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

#### Interacciones del complejo CXCR3-CXCL9.

0 ns		100 ns		200 ns		300 ns		400 ns		500 ns		600 ns		700 ns		800 ns		900 ns		1000 ns	
R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
D13	K28, S57	E4	R27	E15	Q72, K28	D7	R30	N22	K68	D13	S57, K60	A285	K28	N22	T40, K68	D7	R30, R27	D7	R30	E4	R27
E4	R27	D7	R30	A14	T73	E4	R27, T23	Q9	K60	A17	A53	N12	V26, Q72	L286	K68	E4	R27	N22	K68	H8	R27
V5	R27	D13	K60, I64	D7	R30	L3	T23	D13	K60, S55	E21	K50, Q51, K109	D7	R30, R27	N12	V26	S6	R30	S26	K68	S6	R30
M1	E59, E62	Q9	R30, E62	E4	R27	N12	K28	E15	T7,55	L20	K109	E4	R30, R27	A14	A65	N12	V26	R292	Q72	D7	R30
D7	R30, E59	S24	P54	D195	K123	G284	K28	L11	Q72	D7	Q72, R30, K28	S26	Q38	E15	K28, T66	E15	K28, T66	E15	T66	E21	K109, Q51
S6	G29	D28	K115, R114	N206	K123	E15	G29	D7	G29, R30	E15	K28, N69	N22	K68	L11	Q72	D13	K60	N12	K28	D112	K123
E21	N69	N32	R114	H194	K123	A14	T66	S6	R30	G284	K28	E15	T66	D7	R30, R27	Q9	K60	Q45	N69	D13	S57, K60
		E31	K115, R118	E196	K122	N22	N69, K68	S25	D48	E4	R27	D13	K60	E21	V113, K109	N22	L46	E21	Q51, K109, K50	L19	T66
		D35	R118	E31	K115	E21	K68, K109	N32	Q117	N22	L67	E21	K109	E196	K109, K122	Q45	K68	E4	R27	E15	T66, K28, Q72
				D35	R118	E196	K122	D28	Q117, R114	N12	V26	E196	K109, K122	H194	K122	Y29	D48	Y29	K50, D48	A285	K28

				D28	Q117, R114	D195	K123	Y29	L46	D28	R114, S116, K115	D195	K122	D195	K122	E21	K50, K109	D13	K60	R292	Q72, N69
				S25	R114	H194	K123	E21	Q51	E31	K115, R118	H194	K122, Q121	Y29	L46	S24	K109	S25	D48	N22	K68
				S24	R114	H193	K123	S24	K109	D35	R118	N32	R114	S25	D48	N32	R114	N32	R114	D46	N69, K68
				E21	Q51, K50	N206	K123	N199	K115	E196	K122	E31	K115, R118	N32	R114	D28	R114, K115, S116	D28	R114, K115	Q45	K68, N69, Q44
						S24	R114	E31	K115	L198	R120	D28	R114, S116	S24	R114	E31	K115	D35	R118	D195	H105
						D28	R114, S116, K115	D35	R118	D195	K122	D35	R118	D28	R114	D35	R118	E31	R120, K115	H193	K103
						E31	K115, R118	E196	K109, K122	A192	K123			N199	K115, R118	A192	T124	S36	R120	Y29	K50
						D35	R118	D195	K122					E31	R118	N199	S119, R120	D195	K122	D35	R118
								E4	R27					D35	R118	A200	R120	E196	K122	E31	R118
								H194	K122					D13	K60	H194	K122	H194	K122	N199	R122
														N206	T125	E196	K122	A192	K123	Y27	S119
																D195	K122			D28	R118, R114
																				S24	R114
																				N32	R114

**Interacciones entre los segmentos transmembranales de la simulación CXCR3-CXCL9 CG-MD.**

100 ns: R252-V321, 400 ns: Y150-A253, 700 ns: Y150-A253, 800 ns: Y150-A253.

0 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-A96, D99	-	-	-	-	Y60-S301
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	-	F135-W268	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	Y271-K300

100 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	T105-Y308
TM3	-	-	-	-	-	N134-Y271	R149-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-R216, Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	A222-H272 G223-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

200 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

TM1	-	Y60-A110	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134 L102-N134	H94-W176	-	-	T105-Y308 W109-S301
TM3	-	-	-	-	N132-R216, Q219 G128-R216	-	S146-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-R216, Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	L225-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

300 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134 L102-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	-	G128-R216 N132-L220	F131-Y271 Y150-L256	-
TM4	-	-	-	-	D186-R216, Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	R216-Y271	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

400 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	Y60-A110	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	L102-N134	-	-	-	T105-Y308
TM3	-	-	-	N132-F182, D186	N132-R216	F131-Y271	-
TM4	-	-	-	-	F182-Q219 D186-R216	-	-
TM5	-	-	-	-	-	F224-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

500 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99- N134	-	-	-	T105-Y308
TM3	-	-	-	N132-D186	Y136-F224	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-R216, Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	L225-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	V274-K300

600 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	D99-N314, T100	-	-	-	Y60-S301 N71-Y308
TM2	-	-	D99-N134 L102-N134	-	-	-	L104-Y308
TM3	-	-	-	-	N132-R216, V221 Y136-F224	Y150-L256	-
TM4	-	-	-	-	F182-R216 D186-R216	-	-

TM5	-	-	-	-	-	G223-H272 L225-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

700 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-A96	-	-	-	-	-
TM2	-	-	H94-W176	-	-	-	L102-Y308 T105-S304
TM3	-	-	-	-	N132-R216 Y136-F224	F131-Y271	S146-N314
TM4	-	-	-	-	D186-R216	-	-
TM5	-	-	-	-	-	L225-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	V274-K300

800 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-A96	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134 L102-N134	-	-	-	D99-Y308 T105-S304
TM3	-	-	-	N132-F182 N132-D186	N132-R216, Q219	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-R216, Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

900 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	A75-T100 S80-H94	-	-	-	-	-
TM2	-	-	L102-N134	H94-W176	-	-	-
TM3	-	-	-	-	Y136-F224	F131-Y271	N134-Y308
TM4	-	-	-	-	D186-R216, Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

1000 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	T105-Y308
TM3	-	-	-	-	G128-R216 N132-R216, Q219 Y136-F224	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-R216, Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	L225-W268 P227-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

**Interacciones del complejo CXCR3-CXCL10.**

0 ns		100 ns		200 ns		300 ns		400 ns		500 ns		600 ns		700 ns		800 ns		900 ns		1000 ns	
R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
E15	R29	E4	S34, R73	C38	K87	Y27	A81	E31	K87	Y27	K87	D13	R59	S24	K91	E15	R29	P42	K67	E21	K91, V28
E4	R73	E15	R29	S40	K87	S24	L86	D28	K87	E31	K87	E15	R29	E21	K91, Q55	H8	C32	P44	K72	E15	R29
D13	R59	D13	R59	D28	K87	E21	V28	T39	K87	D46	K72, P52	R197	E71, A64	E15	R29	D13	C32, R59	D46	K72	T39	A64
Q9	R37, C32, R59			E21	K91	D7	K80	N50	V28	F47	P52	D195	K47	N22	R29	D7	K80	E4	R43	H8	C30
				D7	K80	D13	R59	D7	K80	Q45	A53	E4	R43	D28	K67	C43	M66	L3	Q38	S6	S79, K80
				D13	R59, I75	L3	R43	S6	K80, R59	N22	V28	S6	N76	T39	K67	E21	K91, V28	E21	K91	D13	R59, K80
				H8	S34	E4	R43	E15	R29	E21	V29, K91	N12	K80	D13	R59	E31	K87	E15	R29	D7	K80
				V10	C30	E15	R43	A14	R28	E15	R29	D7	K80	E4	R43, K80	V115	K72	V10	V28	N12	K80
				E15	R29			D13	R59	D13	R59	E21	K91	E7	K80	D46	K72	D13	C30, R59	M1	S34
								E4	R43	H8	K67	S24	L86			S48	Q55	N12	K80	D28	K67
								E21	K91	E4	E4	T39	K87			S40	T65, K67	D7	K80	S40	K67
								Q45	K91			D28	K87			E4	R43	Y27	L86	C43	M66
								D46	Q55, S54, K72									E31	K87	P44	K72
																		S40	T65	Y27	K87
																				E31	K87
																				E4	R43
																				D46	S54
																				F47	P52

**Interacciones entre los segmentos transmembranales de la simulación CXCR3-CXCL10 CG-MD.** 0 ns: Y223-H237, Y235-M254, L256-A253 and V258-M254, 200-300 ns: Y150-H337.

0 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N72-T100	-	-	-	-	Y60-S304
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	W109-Y308
TM3	-	-	-	-	-	-	-
TM4	-	-	-	-	D196-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	F364-H310

100 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	N132-Q219	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

200 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	D99-Y308
TM3	-	-	-	N132-F182, D186	-	-	N134-G307 L141-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

300 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	Y60-Y308
TM2	-	-	D99-N134 W109-V126	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	N132-Q219	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

400 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-T100	-	-	-	-	Y60-S304
TM2	-	-	D99-N134	H94-W176	-	-	L102-Y308
TM3	-	-	-	N132-F182, D186	N132-Q219	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	Y235-N314
TM6	-	-	-	-	-	-	-

500 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	Y60-W109 N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	L101-W176	-	-	T105-Y308
TM3	-	-	-	N132-D186	N132-Q219	-	N134-G307
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

600 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-L95 Y60-W109	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	H94-W172, W176	-	-	T105-Y308

TM3	-	-	-	N132-D86 D148-T171	N132-Q219	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

700 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99 Y60-W109	-	-	-	-	N71-C311
TM2	-	-	-	-	-	-	D99-Y308 L102-Y308
TM3	-	-	-	N132-D186	-	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	F224-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

800 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	Y60-T105	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	D99-Y108
TM3	-	-	-	N132-D186	N132-Q219	-	N134-G307 R150-Y318
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	F264-H130

900 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99 Y60-T105	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	H94-W176	-	-	L102-Y308
TM3	-	-	-	-	-	-	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

1000 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	Y60-T105	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	H94-W176	-	-	L102-Y308
TM3	-	-	-	-	Y136-Q219	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

Interacciones del complejo CXCR3-CXCL11.

0 ns		100 ns		200 ns		300 ns		400 ns		500 ns		600 ns		700 ns		800 ns		900 ns		1000 ns	
R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
N22	A48	D7	K26	D46	K80	E21	R83	E15	K38	S6	F25, K26	D7	K26	E4	R27	E15	N55, K47	V2	R27	D13	R29
A18	S49	E4	R27, G28	E293	K88	S25	R83	D13	R29	M1	K26	E4	K26, R27	D13	R29	E4	R27	E4	R27	R197	E90, V89
D46	K87	S6	R229	E15	K70	V5	R29	E4	R27	D7	K26	L3	R27	E15	K70	D7	G28, R27, K26	D7	V37, K38	S6	K38
L11	Q72	D13	R29	H8	G28, K26	D13	R29	D7	K26	E4	R27	E21	R83	H194	R91	A18	R83	E15	K47, K41	D7	K38
V2	M24	N289	K88, K47	Q9	K26	E4	R27	N50	K78	E15	K70	A18	N56	D195	R91	E21	R83	D13	R29	S40	R91
E33	K92	E15	K70	D7	K26, R27	S6	R27, G28	F47	K80	D13	R27, R29	E15	Y52, S49, K70	E196	R91	E31	K92	E21	R83	E33	R91
Q9	R29	D46	K80	E4	R27	D7	K26	E21	R83	A18	S54	H194	R91	E33	R91	Y27	K92	D52	S79	P41	R91
D13	R29, N56	E21	R83	V5	R29	D195	R91	N289	E90	E21	N56, R83	E33	R91	R197	E90	R197	E90	N50	S79, K78	S26	N93
		S25	R83	D13	R29	E33	R91	R197	E90	S25	R83	R197	E90	D7	K26, K47	D13	R29	F47	Q81	A18	K59
		E293	K87	S34	R91	R197	E90	L198	V89	Q45	R83	N199	K88	E31	K92	E293	K88	D46	K87	E21	R83
		Y29	R91	H194	R91	N289	E90, K88	T201	K87	D46	R83, K87	L198	K87	N22	S54	T201	K87	R197	E90	E15	K47
		C290	K87	E196	R91	E293	K88	N199	K88	A200	K87	Q45	K87	E21	R83	N199	K87	E31	K92	F47	Q81
		S26	R91, K92	E33	R91	D46	K80, K87	E293	K88	V118	K87	D46	A82	D46	A82, K87	E33	R91	G30	K92	Q45	K87
		R197	R90	G30	R91	Q45	K80	E33	R91	N199	K88	F47	Q81	E293	K88	D46	K87	E196	R91	D297	Q81
		Y27	K92	E31	K92	E15	K70	G30	R91	N289	K88	S48	S79	D52	K78	S48	K78	E33	R91	E4	K26
		E31	K92	S226	N93, E90	S26	K92			N50	K78	D52	S79, K78							E293	K88
				R197	E90	E31	K92			R197	E90, V89	Y27	K92							N289	K88
				Y29	K87, I86					N22	I85	D13	R29							A287	T65
				N199	K87					E31	K92									N50	K78
				S25	R83					E33	R91										
				E21	I50, R83					S34	R91										
				C43	Q81					H194	R91										
										S48	Q81										

**Interacciones entre los segmentos transmembranales de la simulación CXCR3-CXCL11 CG-MD.** 500 ns: Y150-C234, H237, 600: R252-F320, 700 ns: R252-F320, 800 ns: R252-F320.

0 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	-	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

100 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	-	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

200 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	Y60-S301
TM2	-	-	D99-N134	H94-W176	-	-	D99-Y308
TM3	-	-	-	-	A139-A22 Y150-Q219	N134-Y271 G138-W268	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	G223-W268	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

300 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	Y60-S301
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186, F182	-	G138-W268	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

400 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	Y60-S301
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	-	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

500 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-T100	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	H94-W176	-	-	D99-Y308 L102-Y308

TM3	-	-	-	N132-D186	Y150-C234	N134-Y271 G138-W268	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

600 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	Y60-S301
	-	-	N99-N134	-	-	-	L92-Y318
TM2							D99-Y308 L102-Y308 W109-S304
TM3	-	-	-	N138-F182	Y136-L218 Y150-Y233, C234	G138-W268	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

700 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99 S80-H94	-	-	-	-	-
	-	-	D99-N134	H94-W176	-	-	D99-Y308
TM2							L102-Y308 L104-Y308 W109-S304
TM3	-	-	-	Y150-Y233	G138-W268	-	-
TM4	-	-	-	-	R186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	Y271-L306

800 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	Y60-S301
TM2	-	-	D99-N134	H94-W176	-	-	D99-Y308
TM3	-	-	-	N132-D186	-	G138-W268	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

900 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	H94-W176	-	-	D99-Y308
TM3	-	-	-	N132-Q219	-	N132-Y271 G138-W268	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

1000 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D99-N134	-	-	-	D99-Y308
TM3	-	-	-	N132-D186	Y136-L218	-	-
TM4	-	-	-	-	D186-Q219	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

#### Interacciones del complejo CXCR3-CXCL10 AA-MD.

0 ns		25 ns		50 ns		75 ns		100 ns		125 ns		150 ns		175 ns		200 ns		225 ns		250 ns	
R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
E31	K87	P41	K67	D13	K80	S40	T65, K67	S24	K91	D13	K83	E4	N37	S24	K91	A18	Q55	E21	R59	E21	R59
E4	R43	S40	K67	S48	Q55	P41	K67	D28	K91	E21	K91	A14	C30	D28	K91	E21	R59	A14	C30	D13	K87
D13	R59	C43	K67	S40	K67	C43	K67	S40	A64, K67	Y27	K87	E21	R59, K91	P41	K67	D7	K83	H8	N37	D46	K67
H8	R59, E78, N76	D13	K80	P41	K67	E21	K67	E21	R59			C43	K67	L3	N37	D13	K83			A14	C30
S40	A64	E21	K91	C43	K67			Y27	K87			S40	K67	D7	R29	P41	K67			S6	S36, Q38
D28	K67	NAG32	K87	Y27	K87							Y27	K88	E15	R29	Y27	K67				
S24	K67													E21	R59						
Q116	K72																				
E21	K91																				
N22	V28																				
S48	V28, R29																				
E15	R29																				

#### Interacciones del complejo CXCR3- $\alpha_{10}$ AA-MD.

0 ns		25 ns		50 ns		75 ns		100 ns		125 ns		150 ns		175 ns		200 ns		225 ns		250 ns	
R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A
R250	D337	R250	D337	R342	D25	A84	H195	R342	E27	S364	K209	R353	D19	R149	D193	T83	E32	R149	D193	A84	R31
R149	D193	E327	R31	R82	T190	R353	D19	Y365	L353, W258	Y365	L353	T157	K192	R353	D19	R82	E24	R342	E27	T83	R31
L79	E24, R23	W330	E24	T88	D193	R342	D25	Q341	D25	R353	D19	R149	D193	L159	Q333	S80	R25	R161	H56	D89	R31
R342	R23, D25	R342	D25	Y365	G352, W258	R352	C2	R335	D25	T83	H195	R342	E27	Q158	Q333	W330	R23	W330	R23	R249	D341
W330	E37	S87	D193	R162	Q33	W330	E24	R353	D19	R342	D25, E27	S366	F354	R161	Q51, T329	R353	D19	R82	E24	R82	E24
R353	D19	T88	D193	E327	R31	S87	D193	R162	Q333	Y160	Q333	W330	R23	W330	R23	R342	E27	L159	W333	W330	R23
Y265	Q217	Y365	W258, L353	C338	K28	Y365	G217, W258	Y160	Q333	R161	Q51, Q333	R161	I54	R82	E24	T157	D337	T83	R31	R149	D193
R249	D341	R161	H56	R353	D19			A84	T190	R149	D193	Y365	G217, W258	R342	E27	R161	Q51, K53,	D89	R31	Y365	L353

													L353				T329					
		R353	D19	R335	R23			S87	D193	S336	W258	E327	R31	S336	F354	R149	D193	A84	W258	R342	E27	
								E327	R31					Y365	G217	Y365	G217,			Q158	K330	
																	W258				L159	Q333

**Interacciones entre los segmentos transmembranales de la simulación CXCR3-CXCL10 AA-MD.**

0 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99 S80-H94	-	-	-	-	W71-C311
TM2	-	-	-	V97-W176	-	-	T105-S304
TM3	-	-	-	N132-D186	N132-Q219	-	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-
25 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-F182, D186	-	-	N134-C311
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-
50 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	S146-Y235	-	A137-N314
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	R216-Y271	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-
75 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	S146-Y235	N134-W268	A137-N314 R149-Y318
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	Q219-Y271	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-
100 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-F182	-	-	A137-N314
TM4	-	-	-	-	-	-	-

TM5	-	-	-	-	-	R216-Y271	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

125 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	-	N134-W268	A137-N314
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	R216-Y271	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

150 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	-	-	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

175 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-D186	-	N134-W268	A137-N314
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

200 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N71-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	W109-S302
TM3	-	-	-	N132-D186	-	N134-W268	A137-N314
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

225 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	A76-D99	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	-
TM3	-	-	-	N132-F182	-	N134-W268	A137-N314
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

250 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	W109-S302
TM3	-	-	-	N132- F182, D186	N132-Q219	N134-W268	A137-N314

TM4	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	Q219-Y271
TM6	-	-	-	-	-	-

**Coordenadas del modelo general de interacciones CXCR3-Antagonistas**

ID	X	Y	Z	Docking score
HydrogenDonor	2.11763237	-0.30249435	24.0271418	-7.38797992
HydrogenAcceptor	4.07133052	0.38834363	23.1344981	-7.06355805
Positivelon	3.18924941	1.48991084	22.7151267	-7.71650499
HydrogenDonor	1.52017682	9.42494474	28.9919468	-7.84607527
HydrogenAcceptor	3.79620948	1.31295872	20.3542982	-8.77217125
HydrogenDonor	4.80722679	2.00295143	10.1468125	-7.67327206

Dirección General de Bibliotecas

Anexo III. Interacciones de los complejos CXCR6 y CXCR6-CXCL16s

Interacciones entre los segmentos transmembranales de la simulación CXCR6 CG-MD

0 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	N72-S152	-	-	D77-R280, N284
TM3	-	-	-	I111-S159	Y114-T194	-	S116-R280
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	Q195-Q244	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-
100 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	N79-R285
TM2	-	-	A76-N112	N72-W156	-	-	A76, D77-R280
TM3	-	-	-	-	T110-V162	T124-T206	N112-R280
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	Q195-N248 G199-Q244	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243-R280
200 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	D77-N112	-	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	T110-S163 I111-S159	-	-	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	S188-k251, S255	-
TM6	-	-	-	-	-	Q195-Q244	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243-R280
300 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	A77-T115	-	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	-	-	S116-F241	Y109-Y278
TM4	-	-	-	-	-	-	N112-R280
TM5	-	-	-	-	-	S188-K251, R254	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243-R280
400 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	N49-P285
TM2	-	-	D77. F80-N112 W87-Y109	-	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	T110-S163	-	S116-F240	N112-R280
TM4	-	-	-	I111-S159	-	-	-

TM5	-	-	-	-	-	S188-K251	-
TM6	-	-	-	-	-	Q195-N248	-

500 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	A76-N112, T115	-	-	-	D77-R280, N284
TM3	-	-	D77-N112	-	-	-	-
TM4	-	-	W87-Y109	-	-	-	-
TM5	-	-	-	T110-S163	T110-Q195	-	-
TM6	-	-	-	-	-	S188-R254, S255	-
TM7	-	-	-	-	-	Q195-Q244	-

600 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	N49-P285
TM2	-	-	-	-	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	T110-S163	-	S116-F240	Y109-Y278
TM4	-	-	-	-	-	-	N112-R280
TM5	-	-	-	-	-	S188-R254	-
TM6	-	-	-	-	-	Q195-Q244, N248	-
TM7	-	-	-	-	-	Y211-F234	-

700 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	A76, D77-N112	-	-	-	D77-R280, N284
TM3	-	-	-	L106, T110-S163	-	F113-Q244	-
TM4	-	-	-	T110-S159	-	-	-
TM5	-	-	-	-	S159-Q195	-	-
TM6	-	-	-	-	-	S188-S255	-
TM7	-	-	-	-	-	Q195-Q244, N2480	-

800 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	N49-P285
TM2	-	-	-	-	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	-	Y114-Q194	F113-Q245	N112-R280
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	S188-R254	-
TM6	-	-	-	-	-	Q195-N248	-
TM7	-	-	-	-	-	-	V236-N284

900 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

TM1	-	-	-	-	-	-	-	N49-P285
TM2	-	-	-	N72-S152	-	-	-	D77-R280, N284
TM3	-	-	-	-	Y114-T194	S116-Q244	-	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	Q195-N248	-	-
TM6	-	-	-	-	-	Y211-F234	-	-

1000 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	D77-R280, 284
TM3	-	-	-	-	-	-	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	F240-R280

#### Interacciones de la secuencia DRF en la simulación CXCR6 CG-MD.

Residuo	0 ns	100 ns	200 ns	300 ns	400 ns	500 ns	600 ns	700 ns	800 ns	900 ns	1000 ns
D126	C122	*Q141, C122, I129	C122, I129, V130	*K143, C122, V130	*K143, C122	*K143, I129, V130	*K143, C122, I129, V130	*K143, C122	*Y138, *K143, Q140, Q141	C122, V131, Q140, Q141	*Q140, *K143, C122, V130
R127	T124	I123, T124	T124	*I123, T124, V131	I124	*Q225, I123	I123	*Q141, *F224, I123	*Q141, I123	*Q141, *F224	*Q141, I123, T124
F128	T124	T124, V132	T124	T124, V131	V125	V125, V132	V125	T124, V125	T124, V125	T124	T124, V131

\* Interacciones entre la cadena lateral de los residuos de la secuencia DRF. Los residuos no polares interactúan a través de la cadena principal.

Interacciones del complejo CXCR6-CXCL16s CG-MD. \* representan los puentes salinos.

0 ns		100 ns		200 ns		300 ns		400 ns		500 ns		600 ns		700 ns		800 ns		900 ns		1000 ns	
R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
E259	R43	D5	R67, Q75	E259	R43, T72, K86	D5	R67	Y260	R43	D25	K42, R57	E259	R43	W258	S33	E259	R43	E21	L77	E259	R43
S18	S78	D9	S37, R67, R73, Q75	D25	R43, I44	M1	R63	E259	R43, G83	E8	K42, R57	D17	K42	E3	R59	D17	K42	D17	K42, S46	E185	G36
D17	K42	G11	T35	E22	K42	E3	R63	E21	R73	Y6	T35, G36	E185	S33	E259	*R43	E3	R59	E259	R43	E21	R57
D9	R67, R73, Q75	H7	S33	E21	S37	G11	S37	S13	R67, R73	G11	T35	D5	R73	Y260	G41	H4	R59	D9	R67	D184	R67
E8	R57, *R63, Q75	E259	*R43, S46	S255	S33	D25	K42	D5	*R57, R59	D9	R67, R73, S80	E8	R63, *R73	D9	R67	D5	R73	E3	R59	D9	R73
S13	R73, Q75	S13	R43	N16	S37, R73	E21	R43	E8	R57, H61	D5	R67	E3	R59	D17	*K42	E8	R63, *R73	E8	R63	D5	R73
M1	T35	S14	R43	S14	S45, R73	S18	R43	D9	R67, Q75	S14	R43	S14	R67	E8	R63, A64, R73	D9	R67	D75	R73	E8	R63, R73
D5	T35, G36	Q24	N56	S13	S45, R73, S80	E22	*R43	H4	*D47, R57	N16	R43	D9	*H66, R67	D5	R73	Y10	C38			H4	H61
		E22	K42	H7	*D47, R57	Y260	K42	H7	D47	E259	R43			S19	S80	D184	R67			N16	K42, L77
		E8	K42, R57	E8	R57, R59	E259	S45	Q20	S33	E3	R63			D184	S37					Y268	K42
		E3	R63	D5	R59	N16	R43, S45	H183	S33	D176	G32			E21	S78					E3	R59
		H4	H61	D9	R67, S78	H4	S78	S19	G32	T264	S51										
						E8	R57, *H61, W79			Y261	S48										
						H7	S33, R57														
						Y10	G41														
						D9	G41, R73														
						Y6	G36														
						D176	G32, T35														
						K177	G32														

**Interacciones entre los segmentos transmembranales de la simulación CXCR6-CXCL16s CG-MD**

<b>0 ns</b>	<b>TM1</b>	<b>TM2</b>	<b>TM3</b>	<b>TM4</b>	<b>TM5</b>	<b>TM6</b>	<b>TM7</b>
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	D77-R280 T83-Y278
TM3	-	-	-	G107, T110-S163	-	Y110-K251	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	L192, Q195-N248	-
TM6	-	-	-	-	-	-	-

<b>100 ns</b>	<b>TM1</b>	<b>TM2</b>	<b>TM3</b>	<b>TM4</b>	<b>TM5</b>	<b>TM6</b>	<b>TM7</b>
TM1	-	-	-	-	-	-	N49-P285
TM2	-	-	-	N72-S152	-	-	D77-R280, N284
TM3	-	-	-	T110-S163	Y114-T194	F133-Q244	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243, Q244-280

<b>200 ns</b>	<b>TM1</b>	<b>TM2</b>	<b>TM3</b>	<b>TM4</b>	<b>TM5</b>	<b>TM6</b>	<b>TM7</b>
TM1	-	N49-D77	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	A76, D77-N112	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	-	-	N112-Q244	N112-R280
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	V236-N284 T243-R280

<b>300 ns</b>	<b>TM1</b>	<b>TM2</b>	<b>TM3</b>	<b>TM4</b>	<b>TM5</b>	<b>TM6</b>	<b>TM7</b>
TM1	-	-	-	-	-	-	N49-P285
TM2	-	-	-	-	-	-	D77-R280, N284
TM3	-	-	-	-	Y114-T197	Y109-K251	-
TM4	-	-	-	-	-	S116-Q244	-
TM5	-	-	-	-	-	Q195, F200-N248	-
TM6	-	-	-	-	-	Y211-F234	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243-R280

<b>400 ns</b>	<b>TM1</b>	<b>TM2</b>	<b>TM3</b>	<b>TM4</b>	<b>TM5</b>	<b>TM6</b>	<b>TM7</b>
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	W87-Y109	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	-	-	N112-Q244	-
TM4	-	-	-	-	-	S116-F240	-
TM5	-	-	-	-	-	-	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243-R280

500 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	Y38-Y278
							N49-P285
TM2	-	-	T83-N112	N72-S152	-	-	D77-N284
TM3	-	-	-	G107, T110-S163	-	-	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	G199-Q244	-
TM6	-	-	-	-	-	-	Q244-R280

600 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	S56-L70	-	-	-	-	-
TM2	-	-	A76-S116	N72-S152	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	T115-S159	T110-Q195	M117, F113-Q244	-
					M117, T121-T206		
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	S188-R254	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243-R280

700 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	T11-S159	-	F113-Q244	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	L198-N248	-
TM6	-	-	-	-	-	-	K251-Y278

800 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	N72-S152	-	-	D77-R280
				T110-S163	T121-T206	F113-Q244	-
TM3	-	-	-	I111-S159	-	Y114-N248	-
				T115-I155			
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	S188-S255	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243-R280
							I232-Y288

900 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	N49-L78	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	I111-S159	T121-T206	-	-
TM4	-	-	-	-	-	-	-
TM5	-	-	-	-	-	S188-S255	-
						L198, G199-N248	
TM6	-	-	-	-	-	-	-

1000 ns	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7
TM1	-	-	-	-	-	-	-
TM2	-	-	A76-S1160	N72-S152	-	-	D77-R280
TM3	-	-	-	-	T110-T197	-	Y109-Y278
TM4	-	-	-	-	V162-T194	-	-
TM5	-	-	-	-	-	S188-R254	-
TM6	-	-	-	-	-	-	T243-R280

#### Interacciones de la secuencia DRF en la simulación CXCR6 CG-MD.

Residuo	0 ns	100 ns	200 ns	300 ns	400 ns	500 ns	600 ns	700 ns	800 ns	900 ns	1000 ns
D126	C122, C122, I129, V230	I129, V130	V130	I129, C122	I129, C122, I129, V130	*K143, I123, V130	*K143, I129, V130	*K143, C122, C122, I129, V130	*K143, *K143, C122, V130	*K143, C122, V130	*K143, C122, I129, V130
R127	I123, *L65, A142, T124, I123, T124, V131	*I123, T124	*F69, I123	I123	I123, T124	I123	I123, V131	I123	I123	*L65, *T66, I123	*Y138, *Y288, *S292, I123
F128	T124, V132, T217, V131, V132	T124, V131, V132	T124, V131, V132	T124, V131, V132	T124, V131, V132	T123, V131, V132	-	T124, V131, V132	T124, V125, V132	T123	V125

\* Interacciones entre la cadena lateral de los residuos de la secuencia DRF. Los residuos no polares interactúan a través de la cadena principal.

#### Docking score y pIC50 de los 82 ligandos reportados como antagonistas de CXCR6.

ID	Docking Score	pIC50	ID	Docking Score	pIC50	ID	Docking Score	pIC50	ID	Docking Score	pIC50
F0-1	-8.02	5.237	F0-26	-8.85	6.456	F0-51	-8.17	4.076	F0-76	-8.79	6.569
F0-2	-7.98	4.398	F0-27	-8.44	5.745	F0-52	-8.95	4.319	F0-77	-9.88	6.585
F0-3	-9.46	4.585	F0-28	-7.91	5.237	F0-53	-9.79	4.31	F0-78	-9.82	6.959
F0-4	-9.06	4.398	F0-29	-8.82	6.796	F0-54	-8.35	4.301	F0-79	-10.71	6.602
F0-5	-7.83	4.398	F0-30	-8.78	6.796	F0-55	-8.75	4.292	F0-80	-10.57	5.509
F0-6	-8.02	4.398	F0-31	-7.48	5.947	F0-56	-9.14	4.284	F0-81	-10.08	7.097
F0-7	-7.65	5.237	F0-32	-8.09	4.418	F0-57	-8.28	4.301	F0-82	-8.92	7.398
F0-8	-8.57	5.824	F0-33	-7.8	6.456	F0-58	-7.88	4.301	-	-	-
F0-9	-8.32	5.022	F0-34	-8.79	5.609	F0-59	-7.7	4.301	-	-	-
F0-10	-8.29	4.721	F0-35	-7.39	6.215	F0-60	-7.52	5.167	-	-	-
F0-11	-7.52	4.398	F0-36	-7.91	4.398	F0-61	-8.11	5.022	-	-	-
F0-12	-8.32	4.398	F0-37	-8.98	4.301	F0-62	-7.4	4.625	-	-	-
F0-13	-8.53	4.398	F0-38	-8.5	4.301	F0-63	-8.79	5.469	-	-	-
F0-14	-7.43	4.398	F0-39	-8.14	4.301	F0-64	-8.63	5.174	-	-	-
F0-15	-9.32	4.398	F0-40	-8.62	4.398	F0-65	-9.83	4.625	-	-	-
F0-16	-7.46	6.208	F0-41	-8.5	4.398	F0-66	-9.42	4.301	-	-	-
F0-17	-8.24	6.854	F0-42	-7.69	4.398	F0-67	-9.89	4.301	-	-	-
F0-18	-8.45	6.102	F0-43	-7.27	4.398	F0-68	-10.39	6.046	-	-	-
F0-19	-8.08	5.678	F0-44	-9.49	4.398	F0-69	-10.26	6.523	-	-	-
F0-20	-8.55	6.796	F0-45	-7.88	4.398	F0-70	-10.08	5.161	-	-	-
F0-21	-8.23	6.194	F0-46	-8.67	4.398	F0-71	-9.94	4.979	-	-	-
F0-22	-7.56	6.032	F0-47	-8.32	4.398	F0-72	-9.67	4.301	-	-	-

F0-23	-8.68	5.796	F0-48	-8.79	4.398	F0-73	-9.37	4.896	-	-	-
F0-24	-8.17	6.076	F0-49	-9.58	4.398	F0-74	-9.31	6.886	-	-	-
F0-25	-8.08	6.387	F0-50	-8.01	4.577	F0-75	-10.74	6.77	-	-	-

#### Coordenadas del modelo general de interacciones CXCR6-Antagonistas

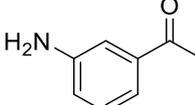
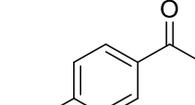
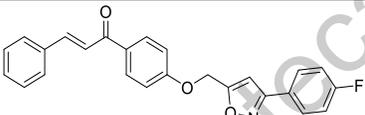
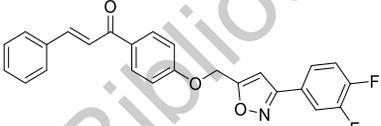
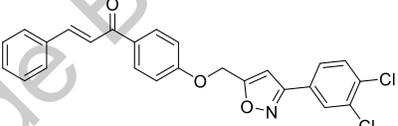
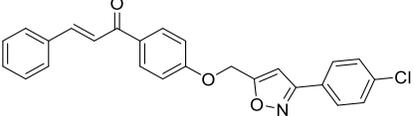
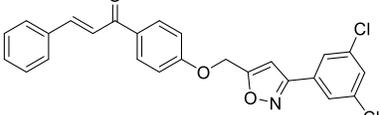
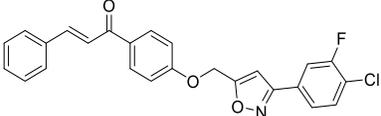
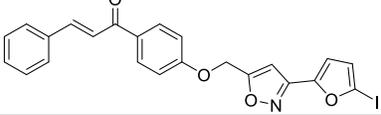
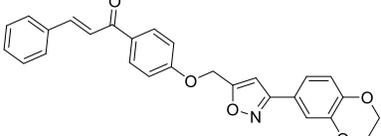
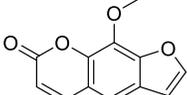
ID	X	Y	Z	pIC50
HydrogenAcceptor	59.3727714	65.3909095	84.6451686	0.35058078
HydrogenDonor	68.0164846	62.7024904	78.145012	0.49724503
Hydrophobic	61.415877	64.3341687	84.2736825	0.23059505
Hydrophobic	59.6718027	64.7809546	84.5175079	0.92742875
HydrogenAcceptor	64.834003	62.398006	86.2247568	0.65716015
HydrogenDonor	64.1215167	71.7991167	87.7533	0.59623049

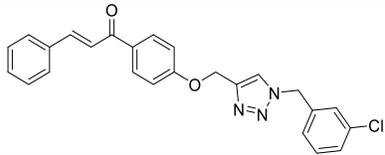
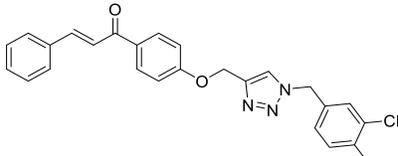
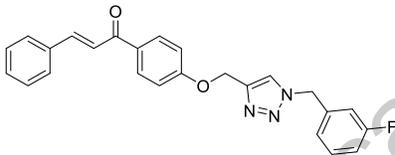
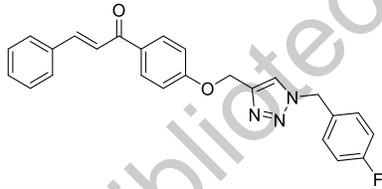
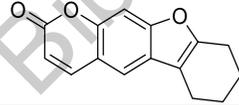
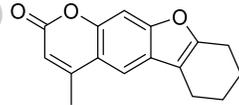
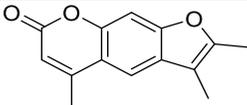
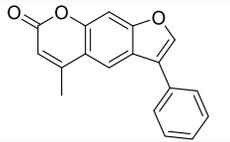
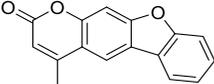
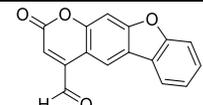
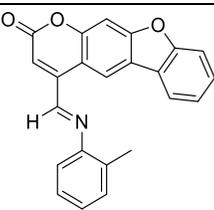
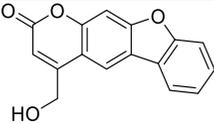
#### Estadística de los diez modelos del 3D-QSAR

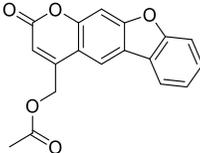
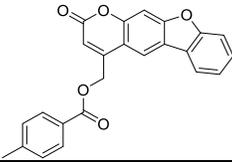
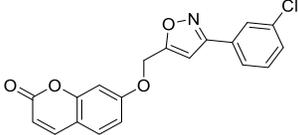
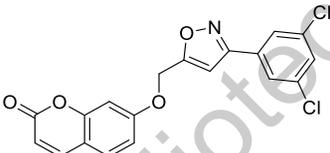
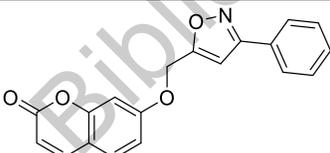
Modelos	q <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	F-Test	Grupo de prueba
Model1	0.6329	0.8639	67.2740	33, 30, 39, 22, 61, 28, 36, 53, 9, 66, 56, 59, 24, 48, 72, 18, 2, 52, 13, 41, 62, 46, 75
Model2	0.6066	0.8427	56.7877	52, 3, 24, 19, 29, 76, 32, 34, 28, 26, 2, 80, 59, 14, 49, 61, 53, 7, 42, 46, 81, 47, 66
Model3	0.5307	0.8076	63.7844	2, 1, 66, 52, 64, 34, 74, 65, 16, 14, 29, 32, 46, 3, 23, 62, 59, 54, 26, 59, 36, 49, 81
Model4	0.4906	0.8718	72.0608	27, 50, 25, 9, 2, 23, 14, 67, 41, 70, 33, 28, 39, 79, 66, 36, 13, 1, 71, 55, 82, 3, 76
Model5	0.5178	0.8637	67.1780	4, 80, 39, 29, 28, 37, 26, 53, 25, 58, 55, 77, 54, 23, 31, 69, 19, 7, 70, 64, 16, 81, 34
Model6	0.2146	0.8054	43.8604	18, 31, 1, 30, 77, 22, 7, 3, 71, 49, 58, 28, 79, 14, 24, 25, 55, 20, 51, 56, 17, 34, 57
Model7	0.6397	0.8731	72.8980	18, 74, 38, 2, 72, 80, 28, 52, 16, 15, 12, 73, 70, 26, 47, 13, 32, 54, 65, 62, 59, 79, 56
Model8	0.5430	0.8624	66.4102	6, 69, 80, 44, 36, 55, 58, 39, 15, 7, 46, 24, 41, 53, 32, 51, 29, 45, 82, 78, 20, 79, 40
Model9	0.5340	0.8479	59.1133	20, 79, 42, 29, 40, 75, 9, 77, 41, 28, 19, 59, 15, 62, 50, 43, 69, 17, 31, 53, 21, 76, 66
Model10	0.5404	0.8264	50.4763	23, 52, 30, 31, 14, 24, 32, 22, 16, 27, 3, 65, 72, 36, 46, 45, 51, 15, 6, 55, 12, 43, 75

Anexo IV: Acoplamiento molecular de ligandos en la enzima tirosinasa.

Base de datos de los activadores alostéricos de la TYR.

ID	Docking Score	Estructura
TYR-active-1	-5.79	
TYR-active-2	-5.36	
TYR-active-3	-8.31	
TYR-active-4	-8.52	
TYR-active-5	-7.55	
TYR-active-6	-8.5	
TYR-active-7	-8.86	
TYR-active-8	-8.45	
TYR-active-9	-9.02	
TYR-active-10	-6.73	
TYR-active-11	-6.8	

TYR-active-12	-9.38	
TYR-active-13	-8.39	
TYR-active-14	-7.84	
TYR-active-15	-7.75	
TYR-active-16	-6.26	
TYR-active-17	-6.65	
TYR-active-18	-7.17	
TYR-active-19	-6.93	
TYR-active-20	-6.41	
TYR-active-21	-6.56	
TYR-active-22	-7.86	
TYR-active-23	-6.74	

TYR-active-24	-7.13	
TYR-active-25	-7.72	
TYR-active-26	-7.02	
TYR-active-27	-7.83	
TYR-active-28	-7.52	

#### Coordenadas del modelo general de interacciones TYR-Activadores alostéricos

ID	X	Y	Z	Docking score
Hydrophobic	2.187852941	15.82792941	6.969184314	-0.836183749
HydrogenAcceptor	-1.014511905	17.79342262	10.84190476	-1.545838463
HydrogenDonor	-14.6287	9.778963889	14.46765278	-2.289475723
Aromatic	-7.534909722	15.30397917	13.18090417	-0.971110578
HydrogenAcceptor	-7.600789474	15.90489474	10.77284211	-2.947390702
HydrogenAcceptor	-4.788855556	15.23582222	18.19411111	-2.424687122
Negativelon	-6.902341667	14.309625	15.02521667	-0.972030651