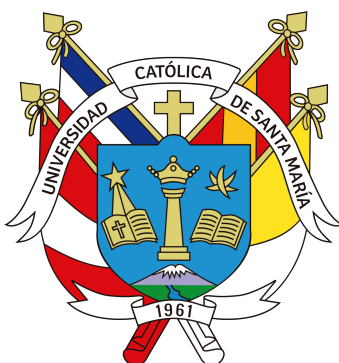


**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas**  
**y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**Estudio de la afinidad energética del B-Caroteno,  
Quercetina, Kaempferol, Licolcalcona-A y Naringenina con  
los sistemas proteicos TP53, IL-6, TNF, ALB y AKT-1**

Tesis presentada por el Bachiller:

**Manrique Gonzales Alessandro Luciano**

**ORCID: 0009-0003-4471-2130**

para Optar el Título Profesional de Ingeniero

Biotecnólogo

Asesor:

**PhD. Gómez Valdez Badhin**

**ORCID: 0000-0001-6539-1207**

**Arequipa – Perú**  
**2024**

UCSM-ERP

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

### TITULACIÓN CON TESIS

#### DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 18 de Enero del 2024

**Dictamen: 008118-C-EPIB-2024**

Visto el borrador del expediente 008118, presentado por:

**2018801461 - MANRIQUE GONZALES ALESSANDRO LUCIANO**

Titulado:

**ESTUDIO DE LA AFINIDAD ENERGÉTICA DEL B-CAROTENO, QUERCETINA, KAEMPFEROL,  
LICOLCALCONA-A Y NARINGENINA CON LOS SISTEMAS PROTEICOS TP53, IL-6, TNF, ALB Y  
AKT-1**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**00476696 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR  
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY  
DICTAMINADOR**



**42671615 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL  
DICTAMINADOR**



# Estudio de la Afinidad Energética del B-Caroteno, Quercetina, Kaempferol, Licolcalcona-A y Naringenina con los Sistemas Proteicos TP53, IL-6, TNF, ALB y AKT-1

## INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<b>mafiadoc.com</b> Fuente de Internet	1%
2	<b>tesis.ucsm.edu.pe</b> Fuente de Internet	1%
3	<b>eprints.soton.ac.uk</b> Fuente de Internet	1%
4	<b>Submitted to Universidad Católica de Santa María</b> Trabajo del estudiante	1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

## Dedicatoria

*Quiero dedicar este trabajo de investigación a mi madre Maribel, a mi padre Elver y a mis abuelos Jorge y Nancy por siempre haberme apoyado y motivado en mis metas y en el desarrollo de mis proyectos de vida.*



## Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mi madre Maribel por apoyarme incondicionalmente y siempre confiar en mí, a mi padre Elver por siempre motivarme a lograr mis metas y a mis abuelos Jorge y Nancy por darme el apoyo necesario para cumplir mis sueños.

Un agradecimiento al PhD. Badhin Gómez Valdez por ser mi asesor de tesis y por aportarme su apoyo y conocimiento a lo largo del desarrollo de este trabajo, a los integrantes del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular que siempre estuvieron ahí para apoyarme.

Finalmente, agradecer a aquellos amigos de la infancia y de la vida universitaria por siempre brindarme una mano cuando lo necesitaba.

## Resumen

La osteoartritis es un trastorno que afecta a múltiples personas, especialmente con el incremento de la edad; al ser una enfermedad sin cura y con tratamientos sintéticos, la bibliografía ha mostrado diferentes metabolitos secundarios de origen natural con múltiples proteínas que participan en la patogénesis de la OA. En el presente trabajo se utilizó cinco sistemas proteicos (AKT1, ALB, IL6, TNF y TP53) y cinco metabolitos secundarios (BCT, KPF, LCA, NRG y QCT) con el fin de evaluar sus energías libres de interacción y poder entender mejor su relación con la enfermedad. Primero se obtuvieron las diversas estructuras necesarias de bases de datos como PDB y PubChem para su posterior Equilibración. Las proteínas se equilibraron en un ensamble NPT a 500ns, a continuación, las biomoléculas se equilibraron con Gaussian 16 y GaussView. Luego se realizó el acoplamiento molecular de cada uno de los sistemas proteicos equilibrados con los cinco metabolitos secundarios, seguida de su proceso de equilibrio en un ensamble NPT a 100ns. Finalmente con los resultados de los complejos equilibrados se analizó la energías de libres de interacción con el método MMPBSA, pudiendo generar un mapa de calor donde se aprecia claramente que la proteína ALB obtuvo las mejores energías libres de interacción con los metabolitos BCT, LCA y NRG; solo la IL6 obtuvo la mejor energía para el KPF, por último la proteína TNF tuvo el mejor resultado para el QCT.

*Palabras Clave: Osteoartritis, AKT1, Albumina, IL6, TNF, TP53,  $\beta$ -Caroteno, Kaempferol, Licochalcona A, Naringenina, Quercetina.*

## Abstract

Osteoarthritis is a disorder that affects many people, especially with increasing age; Being a disease without a cure and with synthetic treatments, the literature has shown different secondary metabolites of natural origin with multiple proteins that participate in the pathogenesis of OA. In the present work, five protein systems (AKT1, ALB, IL6, TNF and TP53) and five secondary metabolites (BCT, KPF, LCA, NRG and QCT) were used in order to evaluate their interaction free energies and better understand their relationship with the disease. First, the various necessary structures were obtained from databases such as PDB and PubChem for further equilibration. Proteins were equilibrated in an NPT assembly at 500ns, then biomolecules were equilibrated with Gaussian 16 and GaussView. Molecular docking of each of the balanced protein systems with the five secondary metabolites was then performed, followed by their equilibrium process in an NPT assembly at 100 ns. Finally, with the results of the balanced complexes, the free energies of interaction were analyzed with the MMPBSA method, being able to generate a heat map where it is clearly seen that the ALB protein obtained the best free energies of interaction with the metabolites BCT, LCA and NRG. ; only IL6 obtained the best energy for the KPF, finally the TNF protein had the best result for the QCT.

*Keywords: Osteoarthritis, AKT1, Albumin, IL6, TNF, TP53,  $\beta$ -Carotene, Kaempferol, Licochalcone A, Naringenin, Quercetin.*

# Índice

Índice	I
Índice de tablas	II
Índice de figuras	III
Glosario	IV
Introducción	1
Objetivos	4
Hipótesis	6
1. Marco Teórico	7
1.1. Osteoartritis . . . . .	7
1.1.1. Factores de Riesgo . . . . .	7
Edad: . . . . .	8
Sexo: . . . . .	8
Genética: . . . . .	8
Lesiones en la articulación: . . . . .	9
Obesidad: . . . . .	9
1.1.2. Patogénesis . . . . .	9
Cartílago y Condrocitos: . . . . .	9

Hueso Subcondral y daño del hueso y cartílago periarticular : .	10
Sinovial y Sinovitis: . . . . .	11
1.1.3. Diagnóstico y Sintomatología . . . . .	11
Examinación física: . . . . .	12
Técnicas de Imagen: . . . . .	12
Biomarcadores: . . . . .	12
1.1.4. Tratamientos . . . . .	13
No farmacológico: . . . . .	13
Farmacológico: . . . . .	14
Quirúrgico: . . . . .	14
Medicina complementaria y alternativa: . . . . .	15
1.2. Proteínas . . . . .	15
1.2.1. AKT serina/treonina quinasa 1(AKT1) . . . . .	15
1.2.2. Albúmina sérica humana(ALB) . . . . .	16
1.2.3. Interleucina-6(IL6) . . . . .	17
1.2.4. Factor de Necrosis Tumoral(TNF) . . . . .	17
1.2.5. Supresor de tumores p53(TP53) . . . . .	18
1.3. Metabolitos Secundarios . . . . .	19
1.3.1. $\beta$ -Caroteno . . . . .	19
1.3.2. Kaempferol . . . . .	19
1.3.3. Licocalcona A . . . . .	19
1.3.4. Naringenina . . . . .	20
1.3.5. Quercetina . . . . .	20
1.4. Mecánica Molecular . . . . .	20
1.4.1. Energía debido al Estiramiento y al Ángulo de Curvatura del enlace . . . . .	22
1.4.2. Energía debido a la Torsión . . . . .	22
1.4.3. Energía debido a las Interacciones de van der Waals . . . . .	23

1.4.4.	Energía debido a las Interacciones Dipolo-Dipolo . . . . .	23
1.4.5.	Potencial de Lennard-Jones . . . . .	24
1.4.6.	Campos de fuerza comunes . . . . .	24
	MM2,MM3 y MM4: . . . . .	24
	AMBER: . . . . .	25
	CHARMM: . . . . .	25
	CFF: . . . . .	25
	OPLS: . . . . .	26
<b>2.</b>	<b>Metodología</b>	<b>27</b>
2.1.	Detalles Computacionales . . . . .	27
2.1.1.	Hardware . . . . .	27
	Softwares, Bases de Datos y Servidores . . . . .	27
	PDB ( <i>RCSB Protein Data Bank</i> ) . . . . .	27
	PubChem . . . . .	27
	UCSF Chimera . . . . .	28
	Modeller . . . . .	28
	Gaussian 16 y GaussView 6 . . . . .	28
	GROMACS 2022.3 . . . . .	28
	PDBSum . . . . .	29
	LigParGen . . . . .	29
	AutoDock Vina . . . . .	29
	MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area) . . . . .	29
	APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) . . . . .	29
2.2.	Metodología . . . . .	30
2.2.1.	Extracción de las estructuras cristalinas de las proteínas: . . .	30
2.2.2.	Extracción de las estructuras de los metabolitos secundarios: .	30
2.2.3.	Determinación la completitud de los sistemas proteicos: . . . .	30

2.2.4. Estabilización de los metabolitos secundarios: . . . . .	31
2.2.5. Minimización de los sistemas proteicos: . . . . .	31
2.2.6. Equilibrio de los sistemas proteicos en un ensamble NPT: . . . . .	31
2.2.7. Análisis de los sistemas proteicos en equilibrio: . . . . .	32
2.2.8. Generación de los campos de fuerza: . . . . .	32
2.2.9. Acoplamiento molecular (“ <i>docking</i> ”): . . . . .	32
2.2.10. Simulación de la dinámica molecular: . . . . .	33
2.2.11. Análisis de las energías de interacción y de las características del potencial electrostático: . . . . .	33
<b>3. Resultados y Discusión</b>	<b>34</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>77</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>79</b>
<b>Referencias</b>	<b>80</b>
<b>A. Secuencias</b>	<b>97</b>
<b>B. Análisis de Estructuras Secundarias</b>	<b>99</b>
<b>C. Análisis de Ramachandran</b>	<b>105</b>

## Índice de tablas

3.1. Secuencia de Aminoácidos de AKT1, ALB, IL6, TNF y TP53. . . . .	34
3.2. Metabolitos Secundarios utilizados en el presente estudio. . . . .	36
3.3. Energías Libre de Interacción, $\Delta G_{int}$ (kcal/mol) . . . . .	74
A.1. Secuencia Fasta del P31749 . . . . .	97
A.2. Secuencia Fasta del P02768 . . . . .	97
A.3. Secuencia Fasta del P05231 . . . . .	98
A.4. Secuencia Fasta del P01375 . . . . .	98
A.5. Secuencia Fasta del P04637 . . . . .	98

## Índice de figuras

3.1. Estructura inicial de las proteínas utilizadas en el presente trabajo. . .	35
3.2. Estructuras 2D de los Metabolitos secundarios. . . . .	37
3.3. Estructuras de las proteínas equilibradas 500ns. . . . .	38
3.4. Raíz Media Cuadrática de las Distancias (RMSD) de los sistemas Proteicos. . . . .	39
3.5. Raíz Media Cuadrática de la Fluctuación (RMSF) de los sistemas Proteicos. . . . .	40
3.6. Radio de giro de los sistemas Proteicos. . . . .	41
3.7. Acoplamiento molecular de la AKT1 con los metabolitos secundarios.	43
3.8. Acoplamiento molecular de la ALB con los metabolitos secundarios. .	44
3.9. Acoplamiento molecular de la IL6 con los metabolitos secundarios. . .	45
3.10. Acoplamiento molecular de la TNF con los metabolitos secundarios. .	46
3.11. Acoplamiento molecular de la TP53 con los metabolitos secundarios. .	48
3.12. Dinámicas moleculares de los complejos con AKT1. . . . .	49
3.13. Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la AKT1. . . . .	51
3.14. Dinámicas moleculares de los complejos con ALB. . . . .	52
3.15. Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la ALB. . . . .	54
3.16. Dinámicas moleculares de los complejos con IL6. . . . .	56

3.17. Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la IL6. . . . .	57
3.18. Dinámicas moleculares de los complejos con TNF. . . . .	58
3.19. Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la TNF. . . . .	60
3.20. Dinámicas moleculares de los complejos con TP53. . . . .	61
3.21. Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la TP53. . . . .	63
3.22. Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la AKT1. . . . .	64
3.23. Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la AKT1 con los metabolitos secundarios. . . . .	65
3.24. Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la ALB. . . . .	66
3.25. Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la ALB con los metabolitos secundarios. . . . .	67
3.26. Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la IL6. . . . .	68
3.27. Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la IL6 con los metabolitos secundarios. . . . .	69
3.28. Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la TNF. . . . .	70
3.29. Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la TNF con los metabolitos secundarios. . . . .	71
3.30. Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la TP53. . . . .	72
3.31. Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la TP53 con los metabolitos secundarios. . . . .	73

3.32. Mapa de calor de las Energías Libres de Interacción . . . . .	75
B.1. Estructura secundaria equilibrada del AKT1 . . . . .	100
B.2. Estructura secundaria equilibrada del ALB . . . . .	101
B.3. Estructura secundaria equilibrada del IL6 . . . . .	102
B.4. Estructura secundaria equilibrada del TNF . . . . .	103
B.5. Estructura secundaria equilibrada del TP53 . . . . .	104
C.1. Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada AKT1 . . . . .	106
C.2. Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada ALB . . . . .	107
C.3. Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada IL6 . . . . .	108
C.4. Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada TNF . . . . .	109
C.5. Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada TP53 . . . . .	110



## Glosario

1. AKT = AKT serina/treonina quinasa
2. AKT1 = AKT serina/treonina quinasa 1
3. Ala = Alanina
4. ALB = Albumina serica humana
5. APBS = Adaptive Poisson-Boltzmann Solver
6. Arg = Arginina
7. Asn = Asparagina
8. Asp = Ácido aspártico
9. BCT =  $\beta$ -Caroteno
10. CTX-II = telopéptido C-terminal de colágeno tipo II
11. Cys = Cisteína
12. Gln = Glutamina
13. Glu = Ácido glutámico
14. Gly = Glicina
15. His = Histidina
16. IL6 = Interleucina-6

17. Ile = Isoleucina
18. IMA = Albúmina modificada por isquemia
19. KPF = Kaempferol
20. LCA = Licocalcona A
21. Leu = Leucina
22. Lys = Lisina
23. Met = Metionina
24. MMPBSA = Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area
25. NF- $\kappa$ B = Factor de Transcripción Nuclear  $\kappa$ B
26. NRG = Naringenina
27. OPLS-AA = Potenciales optimizados para simulaciones de líquidos para todos los átomos o Optimized Potentials for Liquid Simulations for all atoms
28. Phe = Fenilalanina
29. Pro = Prolina
30. QCT = Quercetina
31. RG = Radio de Giro
32. RMSD = Raíz Media Cuadrática de las Distancias
33. RMSF = Raíz Media Cuadrática de la Fluctuación
34. Ser = Serina
35. Thr = Treonina
36. TNF = Factor de Necrosis Tumoral

37. TNFR = Receptor de Factor de Necrosis Tumoral

38. TP53 = Supresor de tumores p53

39. Trp = Triptófano

40. Tyr = Tirosina

41. Val = Valina



# Introducción

En la actualidad, la calidad de vida es un factor importante en la sociedad actual<sup>1</sup>, tanto que cuando tenemos una pérdida en la calidad de vida<sup>2</sup>, esto puede conllevar a problemas de índole psicológico<sup>3</sup> como fisiológicos<sup>2</sup>. La calidad de vida es intrínsecamente importante debido a que nos permite determinar el bienestar de las personas<sup>3</sup>. Una parte fundamental de esto es el bienestar físico, puesto que se relaciona con todos los aspectos del ser humano<sup>4</sup>. Por ejemplo, nuestra salud determinaría si podemos realizar nuestras actividades diarias con normalidad, o incluso si podemos relacionarnos con otras personas. Además, puede resultar importante porque muchas enfermedades pueden ocasionar un sufrimiento tan grave que limita a las personas de diversas formas<sup>2</sup>. Por ello es importante centrarnos en buscar el bienestar físico de las personas mediante el cuidado de la salud y el tratamiento de enfermedades.

Por otro lado, existen seres humanos que presentan una vulnerabilidad al enfrentar malestares fisiológicos<sup>5</sup>. Esta vulnerabilidad acontece por distintos factores<sup>6</sup>, por una parte, está la economía que es determinante para la accesibilidad a servicios de salud, alimentación y entornos no perjudiciales<sup>7,8</sup>. Así mismo, encontramos a adultos mayores y seres humanos que padecen de enfermedades congénitas, que son quienes ya viven condiciones que propician la fragilidad de su salud<sup>9</sup>. Estos sectores de la población tienen una mayor susceptibilidad a sufrir los efectos de enfermedades<sup>9</sup>, ya sea por el acceso reducido a servicios de salud, medicamentos, tratamientos, o consultas médicas<sup>8</sup>. Además de que su fragilidad hace que probablemente ya estén

afrontando otras enfermedades<sup>6</sup>.

Bajo este contexto, es de gran trascendencia estudiar a la osteoartritis, esta es una enfermedad crónica, degenerativa y musculoesquelética que afecta comúnmente a adultos mayores de 60 años<sup>10</sup>. Se caracteriza por la degeneración del cartílago y la degeneración e hiperplasia de huesos adyacentes<sup>11</sup>; por lo tanto, afecta a la diferentes estructuras de las articulaciones y su funcionamiento<sup>12</sup>. Debido a estas afecciones, los pacientes suelen experimentar dolor y rigidez en la articulación<sup>10</sup>, también suele producirse inflamación, pérdida progresiva de la funcionalidad de la articulación y fatiga<sup>13</sup>. Como consecuencia, quienes padecen esta enfermedad ven restringida su movilidad, sus actividades cotidianas se hacen menos accesibles<sup>14</sup>, y su salud mental también se ve afectada<sup>15</sup>.

Este análisis resulta crucial por la gravedad de los daños que deben enfrentar quienes padecen esta enfermedad. En diversos casos, la movilidad puede perderse permanentemente, o por lo menos durante periodos significativos de tiempo<sup>14</sup>. Esto ocurre porque no existe un tratamiento que cure la enfermedad<sup>16</sup>, sólo se busca lidiar con los síntomas y recuperar progresivamente la movilidad articular mediante la aplicación de prótesis en reemplazo de articulación<sup>16</sup>. Asimismo, en términos cuantitativos, un estudio de la Universidad Abierta de China estima que un 20 % de mujeres y un 10 % de hombres del mundo padecen de esta enfermedad<sup>15</sup>. Esta es una proporción significativamente grande de seres humanos, y este criterio cuantitativo nos ayuda a entender la importancia del problema.

La Organización Mundial de la Salud estima que a nivel mundial un 25 % de adultos mayores a 65 años sufrieron dolor y discapacidad asociada a esta enfermedad<sup>17</sup>. El tratamiento actual consiste en el uso de drogas sintéticas para atenuar los síntomas, o cuando la degradación articular es severa se reemplaza la articulación con prótesis. Cuando el tratamiento es en base a medicamentos como antiinflamatorios y analgésicos han mostrado efectos adversos a largo plazo<sup>11</sup>. Recientes reportes acerca de compuestos activos que se hallan presentes como metabolitos secundarios

en plantas, son empleados en la medicina tradicional china. Estos compuestos activos han mostrado algún tipo de actividad terapéutica contra la osteoartritis. Sin embargo, se desconoce o no hay suficiente información acerca de los mecanismos por el que estos compuestos activos sirven como medicamentos para la osteoartritis. Por lo tanto, un campo abierto para la investigación sobre la afinidad energética de estos compuestos activos con sistemas proteicos del organismo que estén relacionados con la osteoartritis es de crucial importancia.



# Objetivos

## Objetivos Generales

- Determinar la afinidad energética de los cinco metabolitos secundarios con cinco de los sistemas proteicos.

## Objetivos Específicos

1. Hallar las estructuras de las cinco proteínas y de los cinco metabolitos secundarios en las bases de datos de PDB y PubChem.
2. Determinar la completitud de los sistemas proteicos y en caso de faltar residuos, proceder a su predicción de las estructuras mediante el programa Modeller de UCSF Chimera.
3. Estabilizar a nivel de Mecánica cuántica los metabolitos secundarios, utilizando las aproximaciones semiempíricas y de teoría funcional de la densidad.
4. Minimizar las fuerzas en cada uno de los cinco sistemas proteicos en estudio.
5. Equilibrar en un ensamble NPT los sistemas proteicos.
6. Generar los campos de fuerza para las cinco estructuras de los metabolitos secundarios.
7. Producir las estructuras ensambladas *Docking* entre los sistemas equilibrados y los metabolitos secundarios.

8. Realizar la simulación de dinámica molecular para los sistemas ensamblados, por un espacio de tiempo de 100ns.
9. Analizar los resultados tanto de las energías de interacción mediante MMPBSA y de las características del potencial electrostático con APBS



## Hipótesis

- Mediante el uso de métodos bioinformáticos es posible reconstruir un mapa de calor que nos genere los sistemas que presenten una mayor interacción entre los sistemas proteicos interactuando con cinco compuestos activos. Estos últimos metabolitos secundarios parecen tener una relación con la disminución de los efectos de la osteoartritis.

# Capítulo 1

## Marco Teórico

### 1.1. Osteoartritis

La osteoartritis (OA), una de las formas de artritis, es considerada la mayor causa de discapacidad para los adultos mayores de 65 años<sup>18</sup>. La OA se define como un desorden degenerativo del cartílago articular asociado a cambios hipertróficos del hueso<sup>19</sup>. La OA es un grupo de diferentes enfermedades con diferentes etiologías, por ello Nuki<sup>20</sup> describe esta enfermedad como “el resultado clínico y patológico de una variedad de trastornos que resultan en alteraciones estructurales e insuficiencia funcional de las articulaciones sinoviales”; este autor describe que la OA se genera al momento de que el equilibrio dinámico entre el deterioro y la reparación de los tejidos de la articulación se ven abrumados<sup>21</sup>.

#### 1.1.1. Factores de Riesgo

Esta enfermedad común tiene alguno de los siguientes factores de riesgo: la edad avanzada, la genética, la obesidad, el sexo femenino y lesiones<sup>22</sup>.

**Edad:**

Está claro que tanto la prevalencia como la incidencia de la OA se relaciona con la edad, encuestas han mostrado que la incidencia de esta enfermedad aumenta de 2 a 10 veces desde los 30 hasta los 65 años<sup>23</sup>. En radiografías la presencia de OA aumenta con la edad en las diferentes articulaciones; un estudio realizado en Holanda enseñó que a los 40 años en un rango del 10 % y 20 % de mujeres mostraban en radiografías la enfermedad en estadios graves en manos y pies, y además a los 70 años el porcentaje de incidencia aumentó hasta el 75 %<sup>24</sup>. Por lo tanto, el incremento de la OA con relación a la edad posiblemente se deba como una consecuencia de todos aquellos cambios biológicos que incluye el envejecimiento. Los condrocitos tienen una menor capacidad de respuesta frente a los factores de crecimiento que estimularán la reparación del tejido<sup>25</sup>. El envejecimiento también implica una respuesta neurológica más lenta y el decrecimiento de la fuerza, debido a esto no solo los mecanismos de protección en las articulaciones se ven afectados, sino que el propio cartílago se adelgaza propiciando a la degeneración de la articulación<sup>26,27</sup>.

**Sexo:**

Se ha demostrado en los estudios que los hombres menores de 50 años tienen una mayor incidencia de OA en comparación a las mujeres, sin embargo, superando los 50 años son las mujeres quienes tienen mayor probabilidad de padecer esta enfermedad<sup>28</sup>. Respecto a las articulaciones afectadas se ha demostrado que la OA de cadera es más frecuente en hombres mientras la OA que afecta a la rodilla, manos y pies es más recurrente en mujeres<sup>29</sup>.

**Genética:**

Los diferentes estudios realizados han mostrado que esta enfermedad tiene un componente genético a resaltar, la OA primaria al ser de aparición tardía se clasifica como poligénica y multifactorial, es decir, que los diferentes factores ambientales son

relevantes para la expresión génica<sup>30-33</sup>. Por otra parte, se encontró que la heredabilidad es más fuerte entre las mujeres de la familia en comparación de los hombres<sup>34</sup>.

### **Lesiones en la articulación:**

Las diferentes lesiones tales como fracturas, luxaciones, roturas de ligamentos y meniscos se asocian al padecimiento de la OA; se han realizado estudios en los que ha quedado demostrado que la pérdida de la integridad del ligamento cruzado anterior, el daño en el menisco y las meniscectomías generan OA de rodilla<sup>35</sup>. También las alteraciones en la superficie articular el estrés por contacto y predisponen a la articulación de desarrollar aceleradamente esta enfermedad<sup>36</sup>.

### **Obesidad:**

La obesidad es uno de los factores de riesgo que más prevalencia tiene, especialmente para osteoartritis de rodilla. Las mujeres con sobrepeso tienen una mayor predisposición a desarrollar osteoartritis de rodilla; queda claro que es el aumento del peso corporal lo que precede a la aparición de la enfermedad<sup>37,38</sup>.

## **1.1.2. Patogénesis**

Debido a que la osteoartritis afecta a toda la articulación tanto el cartílago como el hueso subcondral y el líquido sinovial, estos tienen un rol significativo en la patogénesis de la enfermedad<sup>10,21</sup>. Una articulación normal sinovial está conformada por el hueso subcondral, el cartílago articular, la membrana sinovial, el líquido sinovial y la cápsula de la articulación; son todas estas estructuras las responsables de que la articulación tenga un correcto funcionamiento<sup>39</sup>.

### **Cartílago y Condrocitos:**

El cartílago de la articulación está compuesto por agua y componentes de la matriz extracelular, especialmente por colágeno de tipo II, agregados y otros pro-

teoglicanos<sup>40-42</sup>. Siendo el colágeno de tipo II la principal proteína estructural porque establece la malla que va a ser estabilizada por otros tipos de colágeno y proteínas no colágenas<sup>10</sup>. La matriz del cartílago es aneural, avascular y está poblada de los condrocitos. Este tipo de células al estar en condiciones fisiológicas no muestran una actividad mitótica y se encargan de mantener la renovación mínima del colágeno, es decir, que regulan la composición bioquímica y la arquitectura del cartílago en respuesta a los distintos cambios químicos y mecánicos del entorno<sup>43</sup>; sin embargo, esta capacidad de renovación va disminuyendo con el envejecimiento y con el desarrollo de la enfermedad.<sup>44</sup> En el desarrollo de la OA la matriz cartilaginosa sufre cambios en su estructura y composición. Estos cambios inician como fibrilaciones superficiales que irán desarrollando fisuras asociadas a la exfoliación del cartílago y finalmente ocurrirá una delaminación y exposición del cartílago y el hueso subyacente<sup>45-47</sup>. En las primeras etapas de esta enfermedad, los condrocitos tendrán una mayor actividad sintética al intentar reparar el cartílago<sup>48</sup>. La alteración de la matriz expondrá a los condrocitos a componentes de la matriz interterritorial, desregulado la función de los condrocitos<sup>49</sup>. Con el progreso de la OA, los proteoglicanos se agotan generando la erosión en la red de colágeno<sup>44</sup>; así como la regulación positiva de genes que codifican proteínas asociadas a la respuesta inflamatoria y al catabolismo<sup>50,51</sup>. Finalmente, los condrocitos tienen una mayor expresión de genes y producción de proteínas asociadas a la hipertrofia<sup>52</sup>, y son inducidos con factores angiogénicos contribuyendo a la invasión vascular y la expansión del cartílago calcificado<sup>53,54</sup>.

### **Hueso Subcondral y daño del hueso y cartílago periarticular :**

El hueso subcondral forma una interfaz entre el cartílago calcificado y el hueso trabecular subyacente<sup>10</sup>. En la osteoartritis ocurren cambios en la estructura y la composición de la placa cortical y del hueso trabecular subcondral. Las alteraciones del hueso subcondral preceden a la degradación del cartílago<sup>55,56</sup>. Estos cambios

son mediados por la actividad de los osteoclastos y osteoblastos; también se forman quistes óseos, lesiones medulares y osteofitos<sup>57-60</sup>.

### **Sinovial y Sinovitis:**

Los sinoviocitos son las células encargadas de la función articular óptima ya que sintetizan factores lubricantes como el ácido hialurónico<sup>61</sup> y la lubricina<sup>62</sup>. El sinovial está compuesto por la membrana y el líquido sinoviales. La membrana sinovial es una capa celular delgada que recubre la cavidad articular y regula el intercambio de moléculas; mientras que el líquido sinovial está compuesto de nutrientes y factores lubricantes<sup>44</sup>. En la OA ocurre una reducción de la lubricación por lo que la sinovitis es característico de esta enfermedad. La sinovitis se caracteriza por la hiperplasia de la membrana sinovial y la infiltración de linfocitos T y linfocitos B; tanto los condrocitos disfuncionales como el daño articular contribuyen al desarrollo de la sinovitis<sup>44,63</sup>.

### **1.1.3. Diagnóstico y Sintomatología**

El dolor en la articulación es el síntoma más común de la OA. Este dolor tiende a empeorar con la actividad, incluso después de un periodo de descanso; a esto se le denomina fenómeno de gelificación. También se genera rigidez, bloqueo e inestabilidad de la articulación; resultando en la pérdida de la funcionalidad y limitando las actividades diarias a causa del dolor y la rigidez<sup>64</sup>. Dentro de las articulaciones más afectadas tenemos: la de las manos, rodillas, caderas y de la columna. La OA es una enfermedad asimétrica, por ejemplo, un paciente puede sufrir los síntomas en una rodilla mientras que en la otra tiene un funcionamiento normal<sup>65</sup>.

En el diagnóstico clínico de la osteoartritis es necesario la presencia de síntomas en los pacientes; por ello, la prevención y el alivio de los síntomas es el principal objetivo del tratamiento. Definir la presencia de OA con solo los síntomas representa una gran dificultad debido a que los síntomas se desarrollan en estadios avanzados

de la enfermedad<sup>10</sup>. Otra dificultad es la fluctuación de los síntomas respecto al tiempo y la influencia de la patología y la modulación de la vía del dolor<sup>66</sup>. En la osteoartritis en etapas tempranas existe una pérdida evidente del cartílago sin artropatía inflamatoria independientemente de la presencia de síntomas<sup>10</sup>.

### **Examinación física:**

El diagnóstico se debe basar en la historia clínica y la examinación física del paciente. En la examinación físico se evalúa el rango del movimiento articular y del dolor; cada articulación tiene diferentes formas de evaluación física<sup>65</sup>. También se debe incluir un análisis de índice de masa corporal para indicar al paciente si tiene sobrepeso u obesidad. Las características que sugieren la presencia de OA son: sensibilidad, crepitación con el movimiento articular, agrandamiento óseo, rango de movimiento restringido, deformidad, dolor en el rango de movimiento, inestabilidad de la articulación y debilidad de los músculos periarticulares<sup>67</sup>.

### **Técnicas de Imagen:**

Las técnicas de imagen se utilizan para confirmar la presencia de la OA, especialmente la radiografía simple. En la radiografía se puede observar el estrechamiento del ancho del espacio articular, la formación de osteofitos y el desarrollo de esclerosis y quistes subcondrales<sup>10</sup>; una desventaja de las técnicas de imagen como es la radiografía es que no puede usarse para la detección temprana de OA ya que no identifica el daño al cartílago localizado implicando una baja sensibilidad<sup>68,69</sup>. Asimismo, la resonancia magnética permite evaluar los cambios estructurales de la articulación en tres dimensiones con alta resolución<sup>70</sup>.

### **Biomarcadores:**

Las citoquinas, enzimas, constituyentes de la matriz extracelular y productos de la degradación del colágeno tienen un potencial de actuar como marcadores bio-

químicos; debido a que las concentraciones de estas moléculas están relacionadas al metabolismo tisular y se pueden medir en la sangre, orina o líquido sinovial. Dentro de los biomarcadores más investigados y con un mayor rendimiento tenemos al CTX-II (telopéptido C-terminal de colágeno tipo II) y la proteína de matriz oligomérica del cartílago<sup>71</sup>. Este tipo de diagnóstico se puede emplear para detectar a la osteoartritis en etapas tempranas<sup>10</sup>. Por otra parte, el número de biomarcadores en investigación va en aumento desde la expansión de la proteómica; existen estudios proteómicos que muestran biomarcadores específicos para las articulaciones<sup>72</sup>.

#### 1.1.4. Tratamientos

A causa de la carencia de una cura para la OA, las modalidades terapéuticas tienen como objetivo la reducción del dolor y la mejora del funcionamiento articular. El tratamiento debe ser individualizado y siempre debe incluir la combinación de opciones terapéuticas. La jerarquía para tratar la OA debe consistir primero en modalidades no farmacológicas, luego las modalidades farmacológicas y finalmente la cirugía<sup>67</sup>. El tratamiento siempre debe iniciar con terapias seguras y menos invasivas<sup>65</sup>.

##### **No farmacológico:**

Esta modalidad del tratamiento va a iniciar con la terapia en base a ejercicios de fortalecimiento muscular y del rango de movimiento. El uso de férulas y otros aparatos ortopédicos pueden ayudar a mantener la estabilidad de la articulación<sup>64</sup>. Una de las bases de este tipo de tratamiento es la educación del paciente respecto a desarrollar hábitos saludables y modificar el estilo de vida mediante una buena alimentación y ejercicio. La pérdida de peso en pacientes con sobrepeso u obesidad ha demostrado reducir el riesgo de osteoartritis sintomática y una mejora de los síntomas<sup>73,74</sup>.

**Farmacológico:**

La principal base para el tratamiento farmacológico de la OA leve es el paracetamol, debido a su eficacia, seguridad y costo. En caso de que el paracetamol no sea suficiente para el control de los síntomas se inicia la terapia con antiinflamatorios no esteroides, sin embargo, estas drogas han presentado efectos adversos como el sangrado gastrointestinal, disfunción renal y elevación de la presión arterial<sup>75</sup>. Los opioides se aplican para tratar el dolor, pero solo se recomienda a pacientes que no han respondido a los medicamentos previamente mencionados. Debido a su potencial de abuso, los opioides se recetan en dosis bajas con controles para evaluar la dependencia<sup>64,67</sup>. La aplicación de inyecciones intraarticulares de corticoides o de ácido hialurónico (viscosuplementación) han proporcionado alivio del dolor y favorecen a la restauración de la lubricación articular<sup>10,76</sup>; las inyecciones de corticoides han mostrado una mejor tasa de respuesta a corto plazo mientras que las inyecciones de ácido hialurónico tienen mejor tasa de respuesta a largo plazo<sup>65,77-79</sup>.

**Quirúrgico:**

Solo en situaciones en las que los pacientes no hayan respondido al resto de tratamientos se debe proceder con la intervención quirúrgica. Existen diversas estrategias quirúrgicas para tratar la OA. La primera es el reemplazo total de la articulación, que se realiza cuando existe la pérdida completa del espacio articular o un desgaste del hueso; esta técnica es la más relevante respecto a la relación costo-efectividad en etapas avanzadas de la enfermedad<sup>19,80</sup>. Otra estrategia quirúrgica es la osteotomía de rodilla, este procedimiento mostró beneficios respecto al dolor y la funcionalidad de la rodilla, sin embargo, solo se debe realizar a pacientes con osteoartritis de rodilla unicompartmental y se suele considerar para pacientes jóvenes y activos. La cirugía artroscópica de rodilla es otra de las estrategias quirúrgicas que se eligen comúnmente en pacientes con osteoartritis de rodilla<sup>81,82</sup>.

## Medicina complementaria y alternativa:

Complementos como la glucosamina y la condroitina han mostrado propiedades antiinflamatorias y anti catabólicas<sup>83</sup>, al aplicarse en combinación ha tenido resultados favorables y eficaces para aliviar o retrasar la sintomatología de la OA<sup>10</sup>. La crema de capsaicina, derivado de los chiles, se utiliza como analgésico tópico y ha mostrado efectos superiores a los placebos en el tratamiento del dolor de la osteoartritis<sup>84</sup>.

## 1.2. Proteínas

### 1.2.1. AKT serina/treonina quinasa 1(AKT1)

Las AKT serina/treonina quinasas que son reguladoras clave del crecimiento celular, aunque también tienen funciones en la proliferación celular, el metabolismo de la glucosa y la supervivencia<sup>85,86</sup>. Para la AKT1 se conoce que esta tiene una participación al momento de regular la proliferación y la transformación celular; además al tener una gran variedad de objetivos disponibles se puede estimular la proliferación celular mediante diferentes sustratos lo que implicaría una progresión y regulación del ciclo celular<sup>85,87,88</sup>. En el caso de las células mamíferas, cuando reciben un estímulo mitogénico mientras están en la etapa de reposo o G0, se desencadena una cascada de señalización bioquímica; una de estas cascadas es la vía PI3K/AKT que tiene como función el promover el crecimiento celular activando dos enzimas llamadas mTOR y p70S6K<sup>89,90</sup>. Por otro lado, la AKT1 puede tener una activación mediada por el factor de crecimiento lo que conduce que las células de la fase G0 se liberen y lleguen a la fase G1, entonces podemos decir que la AKT1 tiene un papel crucial en al momento de transicionar a la fase G1/S<sup>91</sup>. Respecto a la OA, la AKT1 tiene un papel muy importante en la apoptosis de los condrocitos lo que afecta directamente la progresión de la enfermedad; se ha demostrado que

la inhibición de esta proteína ayudará en la apoptosis y el proceso de senescencia de los condrocitos de tal forma que se mitigaría el desarrollo de la OA<sup>92</sup>. Mientras que la vía de señalización PI3K/AKT es importante en el desequilibrio que ocurre entre la proliferación celular y la apoptosis de las células sinoviales, una activación anormal de esta vía genera una hiperplasia sinovial, infiltraciones del cartílago y el tejido óseo, inducción de angiogénesis ocasionando deformidades articulares y la destrucción del tejido óseo<sup>93</sup>.

### 1.2.2. Albúmina sérica humana (ALB)

La albúmina sérica humana es una proteína que está compuesta de tres dominios de un tamaño similar<sup>94,95</sup>. Debido a que esta proteína tiene una masa molecular adecuada y una carga negativa le permite crear una alta presión oncótica, así como su alta solubilidad en agua hacen que la proteína sirva como transporte para diferentes sustancias insolubles en agua; también se conoce que una alta concentración de la proteína potencia las acciones biológicas de metabolitos activos exógenos y endógenos<sup>96</sup>. La albúmina tiene la capacidad de vincularse a sustancias proinflamatorias y/o mediadoras de la inflamación, es decir, que puede promover la respuesta inflamatoria<sup>97,98</sup>. Últimamente, se ha empezado a realizar ensayos con formas de bajo peso molecular de la albúmina, mediante el empleo de inyecciones intraarticulares para tratar la osteoartritis de rodilla ya que este tratamiento alternativo a mostrado propiedades antiinflamatorias, por lo tanto, ocurre una reducción del dolor, inflamación y una mejora en el funcionamiento de la articulación<sup>99</sup>. Por otra parte, un estudio mostró que una albúmina modificada por isquemia (IMA) en altos niveles es capaz de degenerar el cartílago y por lo tanto promover la OA pero también es posible usar dicha molécula como un marcador para evaluar previamente la progresión de la enfermedad<sup>100</sup>.

### 1.2.3. Interleucina-6(IL6)

La Interleucina-6 es una citocina pleiotrópica típica que se identificó en un inicio como un factor responsable de la inducción de la producción de inmunoglobulinas en las células B activadas<sup>101</sup>. La IL6 tiene una función importante en los procesos de inflamación crónica, es decir, su nivel de expresión aumenta en aquellas enfermedades inflamatorias; en casos de una inflamación aguda y crónica la proteína se secreta en el suero e induce la respuesta inflamatoria transcripcional mediante el receptor  $\alpha$  de la interleucina-6<sup>102</sup>. En la osteoartritis se encontró que la expresión de IL6 aumenta en las membranas y el líquido sinoviales, así mismo, ocurre una hiperacetilación e hipometilación del ADN en el promotor del gen IL-6 en los fibroblastos sinoviales de la OA<sup>103</sup>. La IL6 se considera una citocina importante ya que tiene un efecto en promover la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea en sinergia con la IL-1  $\beta$  y TNF  $\alpha$ <sup>104</sup>.

### 1.2.4. Factor de Necrosis Tumoral(TNF)

El Factor de Necrosis Tumoral actúa como un mediador proinflamatorio pleiotrópico y tiene la principal función de producir la respuesta inmunitaria frente a las infecciones. A pesar de tener un efecto positivo frente a las infecciones la acción del TNF tiene que ser estrictamente regulado para evitar daños a las propias células, una sobreexpresión sin regulación de esta proteína puede dar origen a trastornos inflamatorios y autoinmunes crónicos<sup>105-107</sup>. El TNF se produce como respuesta a infecciones bacterianas, estímulos inflamatorios y de células inmunológicas e incluso células endoteliales, mastocitos y tejidos neuronales<sup>108</sup>. Para ejercer sus funciones biológicas tiene que interactuar con sus receptores de membrana(TNFR, TNFR1 y TNFR2)<sup>109</sup>. La vía de señalización mediante el TNFR1 activa al factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y a las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos; estos procesos se han asociado a respuestas proinflamatorias, citotóxicas y apoptóticas<sup>110,111</sup>. En la osteoartritis, el TNF es considerada como una citoquina clave en

los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, y se ha observado que tiene una alta concentración en el líquido sinovial, la membrana sinovial, el cartílago y la capa del hueso subcondral<sup>112</sup>. También se ha demostrado que el TNFR1 tiene el mayor impacto en la pérdida del cartílago articular en comparación al TNFR2<sup>113,114</sup>. Por otra parte, el TNF tiene efecto en la reducción de la eficiencia respiratoria de las mitocondrias de los condrocitos<sup>115</sup> e induce la producción de iNOS, COX-2 y PGE2 sintasa<sup>116-119</sup>.

### 1.2.5. Supresor de tumores p53(TP53)

El supresor de tumores p53 actúa como un factor de transcripción de alguna secuencia específica con el fin de regular la expresión de genes relacionados con funciones celulares como la apoptosis, detención del ciclo celular, la senescencia, reparación del ADN, diferenciación y glucólisis<sup>120</sup>. La inducción del TP53 en leucocitos promueve la expresión de genes de la familia del receptor tipo Toll(TLR)<sup>121,122</sup>. Los TLR son glicoproteína de membrana que al recibir el estímulo de ligandos activan al NF- $\kappa$ B, factores sensibles al interferón y a la vía de la quinasa activada por mitógenos(MAPK), dando como respuesta la expresión de genes inflamatorios/inmunes<sup>123,124</sup>. Cuando existe una actividad y una expresión desregulada de los TLR se empiezan generar inflamaciones excesivas y enfermedades inducidas por la inflamación<sup>125</sup>. En el caso de la OA, se sabe que existe un aumento en la expresión del TP53 favoreciendo a la patogénesis de este trastorno<sup>126</sup>, de igual forma la regulación positiva de la proteína induce a la senescencia de los condrocitos y la detención del ciclo celular G1<sup>127-129</sup>.

## 1.3. Metabolitos Secundarios

### 1.3.1. $\beta$ -Caroteno

El  $\beta$ -caroteno es un caroteno ya que no poseen oxígenos y tienen hidrocarburos cíclicos en su estructura<sup>130,131</sup>. La dieta con suplementación de carotenoides reduce el riesgo de padecer enfermedades inflamatorias<sup>132</sup> debido a que el estrés oxidativo es el que activa las vías de señalización responsables de la respuesta inflamatoria, siendo el  $\beta$ -caroteno uno de los carotenoides que tiene una acción antioxidante<sup>133</sup>. Este metabolito secundario tiene la capacidad de eliminar radicales peroxilo pudiendo actuar como un inhibidor de los radicales<sup>134</sup>. También es capaz de inhibir la expresión de genes proinflamatorios gracias a la supresión de la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) en macrófagos<sup>135</sup>.

### 1.3.2. Kaempferol

El Kaempferol es un flavonoide por lo que su estructura se deriva del difenilpropano<sup>136</sup>. En diferentes reportes se aprecia que el kaempferol y sus derivados glicosilación tienen una actividad antioxidante<sup>137-140</sup>; siendo el kaempferol un eliminador potente del anión superóxido<sup>141</sup>. Por otro lado, el kaempferol tiene actividad antiinflamatoria gracias a que inhibe la actividad tanto del NF- $\kappa$ B como del TNF- $\alpha$  y de la IL-1 $\beta$ <sup>141-146</sup>. Este metabolito secundario fue capaz de aliviar a la inflamación inducida por IL-1 $\beta$  en condrocitos de ratas con OA gracias a la supresión de NF- $\kappa$ B<sup>147,148</sup>.

### 1.3.3. Licocalcona A

La Licocalcona A es un flavonoide que es aislado de la raíz del regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) y que ha mostrado actividad antiinflamatoria<sup>149</sup>. El potencial antiinflamatorio de este metabolito secundario se debe a que es capaz de inhibir significativamente la fosforilación del NF- $\kappa$ B y por lo tanto su activación<sup>150</sup>. En el caso de la OA, la

lichochalcona A inhibió la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  en condrocitos al momento de activar la vía de señalización Nrf2<sup>151</sup>, esto debido a que dicha vía de señalización puede inhibir la activación del NF- $\kappa$ B<sup>152,153</sup>.

#### 1.3.4. Naringenina

La Naringenina es una flavonona presentada en diferentes frutas cítricas<sup>154</sup>. Este metabolito secundario ha mostrado tener efectos antiinflamatorios y analgésicos ya que inhibe los siguientes procesos: el estrés oxidativo<sup>155,156</sup>, al reclutamiento de leucocitos, la activación de la NF- $\kappa$ B y producción de citocinas proinflamatorias como lo son la TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, etc.<sup>157-159</sup>. Su efecto analgésico se debe a que activa la vía de señalización analgésica NO/cGMP/PKG/ATP de los canales de potasio sensibles<sup>155</sup>.

#### 1.3.5. Quercetina

La Quercetina es un flavonoide que ha mostrado grandes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inductoras de apoptosis, lo que lo hace una biomolécula con efectos positivos para la salud humana<sup>160</sup>. De sus principales efectos antiinflamatorios se aprecia que la quercetina es capaz de reducir en gran medida los niveles de las citocinas TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  de los macrófagos peritoneales<sup>161</sup>, de la misma forma gracias a esta característica es capaz de tener efectos terapéuticos para la OA<sup>162</sup>.

### 1.4. Mecánica Molecular

Esta sección del marco teórico se basa en lo mencionado en el capítulo 11 del libro “Computational Chemistry and Molecular Modeling” de los autores K. I. Ramachandran, Deepa Gopakumar y Krishnan Namboori<sup>163</sup>.

La mecánica molecular abarca tanto a la estructura como la energía de las moléculas, teniendo en cuenta a los movimientos nucleares. En la mecánica molecular no

se considera a los electrones debido a que se asume que estos se encontrarán en su distribución óptima una vez que el núcleo atómico tenga una posición conocida. Por lo tanto, se basan en la aproximación de Born-Oppenheimer en la que se indica que, el núcleo es mucho más pesado que los electrones y su movimiento es significativamente pequeño en comparación con el movimiento de los electrones. La mecánica molecular trata a la molécula como una colección de pesos conectados a resortes, donde los pesos son representación del núcleo y los resortes son representación de los enlaces.

La mecánica molecular depende de 3 herramientas: los campos de fuerza, el establecimiento de parámetros y los algoritmos de minimización. Un campo de fuerza estará compuesto por aquellas funciones y constantes que permiten hallar la energía potencial de una molécula; la energía potencial de un sistema se representa como la suma de todas las funciones de un campo de fuerza. Un campo de fuerza tiene la siguiente ecuación:

$$E_{total} = E_r + E_\theta + E_\phi + E_{nb} + [términos especiales]$$

En esta ecuación tenemos que la energía total ( $E_{total}$ ) es la suma de las energías asociadas al estiramiento del enlace ( $E_r$ ), al ángulo de curvatura del enlace ( $E_\theta$ ), a la torsión del enlace ( $E_\phi$ ) y las interacciones no enlazantes ( $E_{nb}$ ).

El establecimiento de parámetros define los puntos de referencia y las constantes de fuerza, permitiendo los cálculos de diferentes niveles de energía potencial. Los algoritmos que se usan para calcular las nuevas posiciones geométricas para generar la optimización geométrica se denominan optimizadores o minimizadores; para lograr la optimización geométrica se requiere que se alcance el mínimo global.

### 1.4.1. Energía debido al Estiramiento y al Ángulo de Curvatura del enlace

Tanto el estiramiento como la compresión de la posición natural de un enlace están asociadas con el incremento de la energía potencial. Este cambio energético es descrito por una ecuación similar a la ley de Hooke, con la variación de que usa un término cúbico en vez de un término cuadrado; gracias a la inclusión de este término cúbico la energía no se incrementa de forma brusca conforme ocurre el estiramiento del enlace. En la siguiente expresión se muestra el potencial de estiramiento, donde  $k_s$  es la constante de fuerza de estiramiento,  $l_o$  es la longitud natural del enlace,  $l$  es la longitud actual, y 143.88 es la unidad de conversión a  $kcal.mol^{-1}$ .

$$V_{stretching} = 143,88 \frac{k_s}{2} (l - l_o)^2 (1 - 2(l - l_o))$$

El incremento de la energía está asociado a la curvatura de los enlaces. Por lo tanto, se tiene la siguiente expresión matemática para la energía asociada a la curvatura de los enlaces, donde  $k_\theta$  es la constante de fuerza relacionada con la curvatura,  $\theta$  es ángulo actual en grados,  $\theta_o$  es el ángulo natural, y 0.21914 es el factor de conversión.

$$E_\theta = 0,21914 k_\theta (\theta - \theta_o)^2 (1 + 7 \times 10^8 (\theta - \theta_o)^4)$$

Cuando el ángulo de curvatura del enlace disminuye, los dos enlaces que formaban el ángulo se estiraran con el propósito de aliviar la presión.

### 1.4.2. Energía debido a la Torsión

Los tipos de rotaciones intramoleculares como la torsión y los ángulos diédricos requieren de energía. En el caso del potencial de torsión, se trata de una serie de

Fourier que contará las relaciones de enlace directo de 1 a 4.

$$E_{tor} = \frac{V_1}{2} (1 + \cos \omega) + \frac{V_2}{2} (1 + \cos 2\omega) + \frac{V_3}{2} (1 + \cos 3\omega)$$

En esta expresión  $V_1$ ,  $V_2$  y  $V_3$  son constantes de fuerza en las series de Fourier, y  $\omega$  es el ángulo de torsión que va de  $0^\circ$  a  $180^\circ$ .

### 1.4.3. Energía debido a las Interacciones de van der Waals

En los átomos, su radio de van der Waals está relacionado a su tamaño efectivo. Cuando dos átomos no enlazados están cerca, la atracción de van der Waals que existe entre ellos, aumenta. Por ello, tanto la fuerza de van der Waals como la energía correspondiente son inversamente proporcional a la distancia entre los átomos. En el caso de que la distancia entre los átomos iguale a la suma del radio de van der Waals, la atracción es máxima; sin embargo, cuando los átomos están demasiado juntos entre ellos existirá una fuerza de repulsión de van der Waals.

La energía debido a las interacciones de van der Waals tiene la siguiente expresión donde  $\varepsilon$  es el parámetro de energía que determina la profundidad del pozo de energía potencial,  $r_v$  es la suma de los radios de van der Waals y  $r_0$  es la distancia entre los centros de interacción.

$$E_{vdW} = \varepsilon \left[ 2,90 \times 10^5 \exp \left( -12,50 \frac{r_0}{r_v} \right) - 2,25 \left( \frac{r_v}{r_0} \right)^6 \right]$$

### 1.4.4. Energía debido a las Interacciones Dipolo-Dipolo

Solo en algunos campos de fuerza se cuenta a las interacciones electrostáticas como puntos de carga atómicos. En el caso de campos de fuerza como MM2 y MMX, los momentos de enlaces dipolo se usan para representar las contribuciones electrostáticas.

La ecuación para calcular la energía de las interacciones dipolo-dipolo deriva de

la ley de Coulomb.

$$E_{dipole} = \frac{\mu_i \mu_j}{D (r_{ij})^3} (\cos \chi - 3 \cos \alpha_i \times \cos \alpha_j)$$

En esta expresión tenemos que  $D$  es la constante dieléctrica del sistema,  $\chi$  es el ángulo entre los dipolos,  $\mu_i$  y  $\mu_j$  son las cargas correspondientes,  $\alpha_i$  y  $\alpha_j$  son los ángulos entre los dipolos y el vector que conecta los dipolos y  $r_{ij}$  es la distancia entre los dipolos.

#### 1.4.5. Potencial de Lennard-Jones

Los fluidos reales tienen un potencial intermolecular continuo, el cual se aproxima con la siguiente ecuación, donde  $n$  y  $m$  son constantes,  $r_m$  es la separación que corresponde al mínimo de energía y  $x = r/r_m$ .

$$V(r) = \varepsilon \left[ \left( \frac{m}{n-m} \right) x^{-n} - \left( \frac{n}{n-m} \right) x^{-m} \right]$$

Sin embargo, para modelar las interacciones repulsivas de forma más realista se utiliza el potencial truncado de Lennard-Jones.

#### 1.4.6. Campos de fuerza comunes

MM2, MM3 y MM4:

Esta familia de campos de fuerza se emplea generalmente para moléculas pequeñas, debido a que son capaces de identificar hibridaciones  $sp$ ,  $sp^2$  y  $sp^3$  de los átomos de carbono e intermediarios orgánicos. La familia de los campos de fuerza MM fue parametrizada para obtener valores de la difracción del electrón, permitiendo calcular la distancia media entre los átomos sobre el movimiento vibracional a temperatura ambiente.

**AMBER:**

El campo de fuerza AMBER fue parametrizado para un número limitado de sistemas orgánicos, y comúnmente se ha aplicado ampliamente para proteínas y ácidos nucleicos. AMBER también puede ser utilizado para trabajar sobre polímeros y moléculas pequeñas pero añadiendo parámetros adicionales. En general, AMBER da resultados considerables para las geometrías de modelos en fase gaseosa, energías libres de solvatación, frecuencias vibratorias y energías conformacionales. Aquellos campos de fuerza que se basen en átomos unidos, como es el caso de AMBER, usan términos de torsión inadecuados para mantener la estereoquímica en los centros quirales.

**CHARMM:**

El campo de fuerza CHARMM fue parametrizado con datos experimentales y se ha aplicado ampliamente en la realización de simulaciones de moléculas pequeñas hasta complejos solventados de macromoléculas biológicas. CHARMM tiene un funcionamiento óptimo en un gran rango de cálculos y simulaciones, incluyendo el cálculo de energías de interacción y conformación, geometrías, mínimos locales, comportamientos dinámicos dependientes del tiempo, frecuencias vibratorias y energía libre.

**CFF:**

El CFF fue el primer campo de fuerza relevante que fue desarrollado sobre la base de cálculos mecánicos cuánticos ab initio en moléculas pequeñas. Este campo de fuerza tiene mejoras anarmónicas y cruzadas, que se derivan en su núcleo de métodos de ab initio en vez de datos netamente experimentales. CFF fue desarrollado para imitar las propiedades de moléculas como los péptidos y las proteínas. Además, emplean polinomios cuárticos para el cálculo del estiramiento de los enlaces y la curvatura de los ángulos; en el caso de las torsiones usan una expansión de Fourier

de tres términos

### **OPLS:**

En el campo de fuerza OPLS original posee funciones potenciales que usan parcialmente el modelo de átomos unidos(UA).En los sitios para las interacciones no enlazantes se colocan en todos los átomos que no son de hidrógeno, en hidrógenos unidos a heteroátomos o en los carbonos en anillos aromáticos; debido a esto, los únicos hidrógenos que están implícitos están unidos a carbonos alifáticos. El tiempo de cálculo para realizar estas simulaciones de fluidos es aproximadamente proporcional al número total de sitios de interacción al cuadrado<sup>164</sup>.

## Capítulo 2

### Metodología

#### 2.1. Detalles Computacionales

##### 2.1.1. Hardware

Se hizo uso de una estación de trabajo (*WorkStation*), con un procesador AMD® Ryzen 9 5950x 16-core processor × 32, con una memoria RAM de 64Gb, 03 discos duros de 01, 04 y 06TB, dos tarjetas aceleradoras de video, una GTX 980 y una NVIDIA GeForce RTX 3080 Ti.

##### Softwares, Bases de Datos y Servidores

##### *PDB (RCSB Protein Data Bank)*

El RCSB Protein Data Bank es una base de datos que almacena las diferentes estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas como proteínas, ADN y ARN<sup>165,166</sup>.

##### **PubChem**

PubChem es una base de datos del National Institutes of Health (NIH), la almacena molécula pequeñas, macromoléculas como nucleótidos, lípidos, carbohidratos,

péptidos,etc y sobre dichas moléculas recopila información como sus estructuras, propiedades químicas y físicas, actividad biológica, toxicidad, entre otras<sup>167</sup>.

### **UCSF Chimera**

UCSF Chimera es un software gratuito que permite la visualización, análisis y edición de estructuras moleculares tridimensionales, además puede realizar mapas de densidad, simulaciones de trayectorias y alinear secuencias<sup>168</sup>.

### **Modeller**

Modeller es un software, que puede ser incluido en UCSF Chimera, encargado de realizar modelados por homología de estructuras tridimensionales de proteínas, es decir, compara otras estructuras de proteínas al alinear la secuencia de la proteína que se quiere modelar<sup>169-172</sup>.

### **Gaussian 16 y GaussView 6**

Gaussian 16 es un software que permite crear modelos precisos, realizar cálculos como la predicción de estructuras moleculares, frecuencias vibratorias, propiedades moleculares aplicados a compuestos químicos en un entorno informático<sup>173</sup>. Mientras que GaussView 6 es la interfaz gráfica que se usa en conjunto con Gaussian 16, colabora en la creación de archivos de entrada gaussianos, realización de los cálculos desde la interfaz gráfica, entre otras funciones<sup>174</sup>.

### **GROMACS 2022.3**

GROMACS es un paquete de dinámica molecular que es capaz de simular ecuaciones de movimiento newtonianas para sistemas con múltiples particulares, es ampliamente utilizado para proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. GROMACS te permite calcular interacciones entre las moléculas no unidas en el menor tiempo posible teniendo un alto rendimiento en comparación a programas similares<sup>175</sup>.

### **PDBSum**

PDBsum es una base de datos que también permite la visualización de las estructuras tridimensionales de las moléculas depositadas en el PDB. Dentro de sus otras funciones realiza diagramas de las interacciones, como el de LigPlot, y hace uso de softwares gráficos como RasMol, JSmol y PyMOL<sup>176</sup>.

### **LigParGen**

LigParGen es un servidor que genera los diferentes parámetros necesarios del campo de fuerza OPLS-AA para ligandos orgánicos en los distintos formatos que se usan en la dinámica molecular<sup>177-179</sup>.

### **AutoDock Vina**

AutoDock Vina es un software que sirve para realizar el acoplamiento molecular automatizado de moléculas pequeñas como fármacos o sustratos con un receptor que es una estructura tridimensional ya conocida. A diferencia de otros softwares, este calcula las cuadrículas internamente para los diferentes tipos de átomos<sup>180,181</sup>.

### **MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area)**

MMPBSA es un método utilizado para poder calcular la energía libre de interacción entre dos proteínas o una proteína y un ligando. Tiene por objetivo el calcular la diferencia de energía libre ( $\Delta G_{int}$ ) en dos estados de dos moléculas solvatadas<sup>182</sup>.

### **APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver)**

ABPS (Adaptative Poisson-Boltzmann Solver) es un software que se encarga de resolver ecuaciones de electrostatica para sistemas biomoleculares<sup>183-186</sup>.

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. Extracción de las estructuras cristalinas de las proteínas:

En el presente trabajo de investigación se utilizó la base de datos PDB (*RCSB Protein Data Bank*) para extraer las estructuras de la fase cristalina de los cinco sistemas proteicos en formato *.pdb*, estos son: AKT1, ALB, IL6, TNF y TP53.

### 2.2.2. Extracción de las estructuras de los metabolitos secundarios:

La búsqueda de las estructuras de los cinco metabolitos secundarios:  $\beta$ -Caroteno, Kaempferol, Licolcalcona-A, Naringenina y Quercetina se realizó en la base de datos de PubChem. Se descargó las estructuras en formato *.sdf*, posteriormente se cambiará a formato *.pdb*, con el software UCSF Chimera; así como para cada metabolito secundario se tuvo en cuenta la siguiente codificación: BCT ( $\beta$ -Caroteno), KPF (Kaempferol), LCA (Licolcalcona-A), NRG (Naringenina) y QCT (Quercetina).

### 2.2.3. Determinación la completitud de los sistemas proteicos:

Se utilizó el software UCSF Chimera para limpiar las estructuras de los diferentes sistemas proteicos de las diferentes moléculas adicionales que se utilizaron para la cristalización y poder obtener una estructura monomérica de la proteína. Una vez obtenidos los monómeros se completa las estructuras proteicas por homología haciendo uso del servidor Modeller.

#### **2.2.4. Estabilización de los metabolitos secundarios:**

Los metabolitos secundarios se estabilizarán a nivel de mecánica cuántica empleando las aproximaciones semiempíricas y la teoría funcional de la densidad con la aplicación de los programas Gaussian 16 y GaussView 6. Con este proceso se obtendrán los archivos que contienen las cargas de Hirshfeld que posteriormente se cambiarán para la realización de la dinámica molecular.

#### **2.2.5. Minimización de los sistemas proteicos:**

Se realizará la minimización de las fuerzas de cada una de las estructuras de los cinco sistemas proteicos en estudio empleando el software GROMACS 2022.3. Se realizará la minimización de las fuerzas de cada una de las estructuras de los cinco sistemas proteicos en estudio empleando el software GROMACS-2022.3. Para realizar esto se solvatan cada uno de los sistemas con el modelo de agua TIP3P<sup>187</sup> y se añadieron contraiones para neutralizar el sistema y poder incorporar el efecto del ion sal con una concentración de 0.145 M, los iones utilizados fueron sodio y cloro. Con estos pasos ya realizados se ejecutó la minimización con doble precisión para tener la estructura más adecuada; para toda esta etapa y para el resto de los pasos se hace uso del campo de fuerza OPLS-AA<sup>164</sup>.

#### **2.2.6. Equilibrio de los sistemas proteicos en un ensamble NPT:**

Como primer paso cada uno de los cinco sistemas proteicos ya minimizados se pre-equilibran en un ensamble canónico (NVT) a 10ns a una temperatura de 309.65K. Una vez realizado el pre-equilibrio se realiza un equilibrio en un ensamble Isotérmico–Isobárico (NPT) a 500 ns con una temperatura de 309.65K y una presión de un bar. Al culminar la simulación de la dinámica molecular de cada uno de los sistemas proteicos se eliminó las condiciones de la trayectoria para determinar si la zona

estaba en equilibrio, cada uno de estos pasos se realizan con el software GROMACS 2022.3.

### **2.2.7. Análisis de los sistemas proteicos en equilibrio:**

Después de tener los sistemas proteicos equilibrados se realizan con el software GROMACS-2022.3 los análisis Raíz Media Cuadrática de las Distancias(RMSD), Raíz Media Cuadrática de la Fluctuación(RMSF), Radio de Giro. Con el servidor PDBSum se comparó las estructuras secundarias de la estructura inicial y después de la dinámica, así como se obtuvo el análisis de Ramachandran de las estructuras equilibradas.

### **2.2.8. Generación de los campos de fuerza:**

Se generarán los campos de fuerza para cada una de las estructuras correspondientes a los metabolitos secundarios en el servidor de LigParGen y se descargaron los archivos *.gro* y *.itp* ya que se requiere tener los metabolitos secundarios en forma funcional para el campo de fuerza OPLS-AA. En el archivo *.itp* se actualizaron las cargas por las cargas de Hirshfeld.

### **2.2.9. Acoplamiento molecular (“*docking*”):**

Una vez que las estructuras de los sistemas proteicos están en equilibrio y que los metabolitos secundarios estén estabilizados, se produjeron las estructuras ensambladas mediante el método de acoplamiento molecular en el programa AutoDock Vina para obtener la posición de los metabolitos secundarios con la energía más negativa y estable para cada uno de los sistemas proteicos.

### **2.2.10. Simulación de la dinámica molecular:**

Los sistemas proteicos y los metabolitos secundarios se minimizan y equilibran como complejos. La minimización se realizó a doble precisión. Posteriormente en se equilibrio en un ensamble NVT a 5ns con una temperatura de 309.65K para la introducción de la temperatura constante, luego se realizó la simulación en ensamble NPT por 100ns manteniendo la temperatura en 309.65K y con una presión de un bar. Finalmente se eliminaron las condiciones de periodicidad del complejo para su posterior análisis RMSD, RMSF, Radio de Giro. En el servidor de PDBSum se analizó la interacción y si existió la formación de enlaces de hidrógeno en el último frame de la dinámica molecular de cada complejo.

### **2.2.11. Análisis de las energías de interacción y de las características del potencial electrostático:**

Los resultados de las energías de interacción  $\Delta G_{int}$  (kcal/mol) de las estructuras ensambladas serán analizados mediante el método de MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area); con las energías obtenidas se realizará un mapa de calor para su posterior comparación. En el caso de las características del potencial electrostático se hará empleo del software APBS para analizar las cargas de las superficies y comparar el potencial electrostático de las proteínas equilibradas y después de su interacción con los diferentes metabolitos secundarios.

## Capítulo 3

# Resultados y Discusión

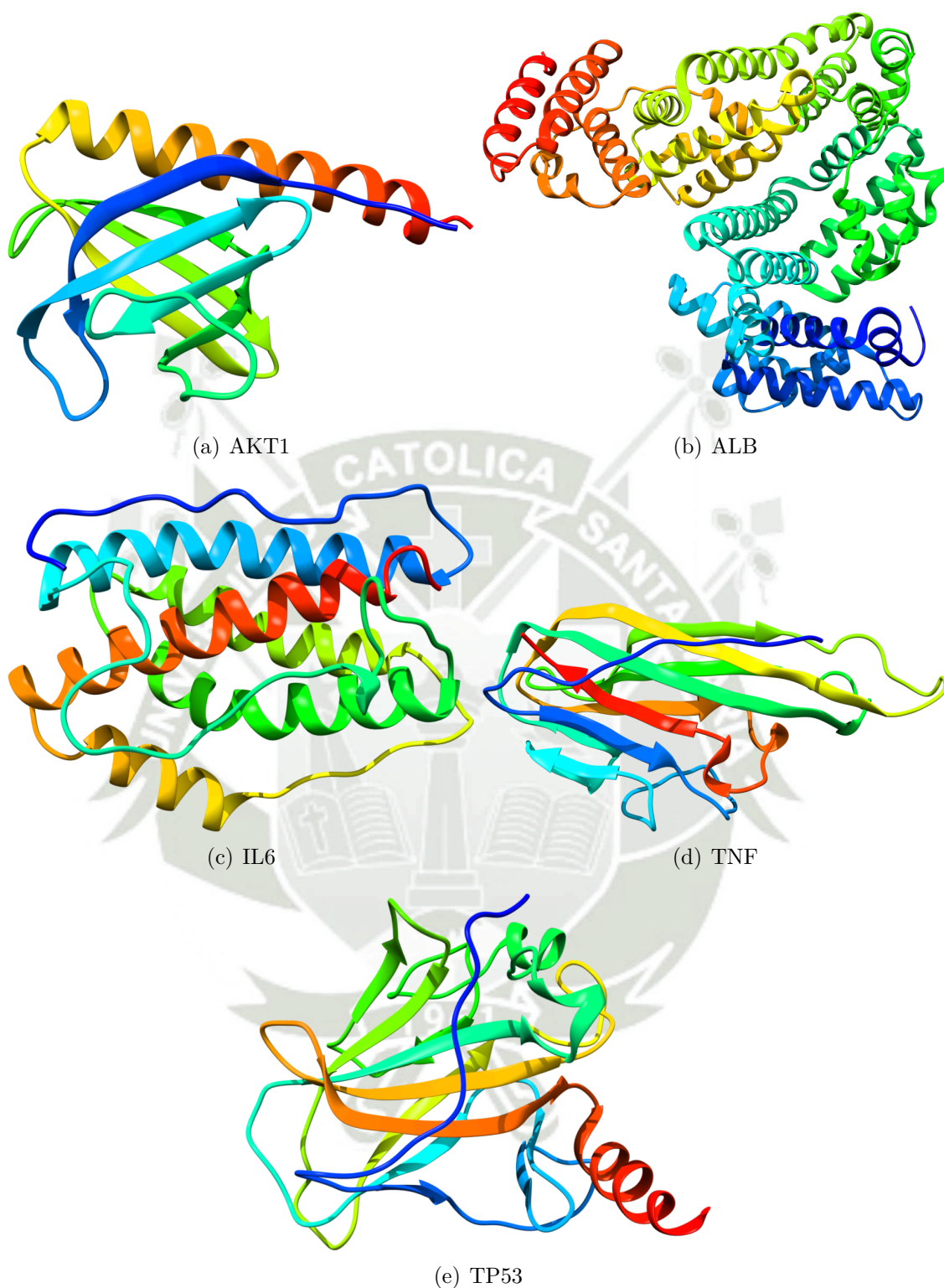
Se realizó la búsqueda de las secuencias de interés para la proteína AKT1 en el servidor de Protein Data Bank, ubicándola con el código 1UNP<sup>188,189</sup>, e identificador de UniProt P31749 (ver tabla 3.1), la secuencia se hallaba incompleta en los dos (02) primeros residuos aminoácidos desde el 01M al 02S, por lo que procedió a completarlo utilizando los comandos del software UCSF Chimera.

**Tabla 3.1:** Secuencia de Aminoácidos de AKT1, ALB, IL6, TNF y TP53.

Código	Nom. Científico	AA	Secuencia de aminoácidos
P31749	AKT1_HUMAN	480	MSDVA...ASGTA (A.1)
P02768	ALBU_HUMAN	609	MKWVT...AALGL (A.2)
P05231	IL6_HUMAN	212	MNSFS...ALRQM (A.3)
P01375	TNFA_HUMAN	233	MSTES...GIAL (A.4)
P04637	P53_HUMAN	393	MEEPQ...GPDS (A.5)

Para el caso de la ALB, se procedió a su búsqueda en el servidor de Protein Data Bank, encontrando una estructura con el código 1N5U<sup>190,191</sup>, así como su identificador de UniProt P02768 (ver tabla 3.1), al revisar la completitud de la estructura se encontró que dos (02) aminoácidos, 25D y 606L, faltaban por lo que se completaron con los comandos del software UCSF Chimera.

Por otro lado, la estructura de la IL6 se encontró en el servidor de Protein Data Bank con el código 1ALU<sup>192,193</sup> y con su identificador de UniProt P05231; al revisar



**Figura 3.1:** Estructura inicial de las proteínas utilizadas en el presente trabajo.

la secuencia esta estaba incompleta desde los residuos 27M al 46P y 80S al 88N debido a esto se completó haciendo uso del servidor Modeller.

Igualmente, para la proteína TNF, su estructura fue recolectada del servidor

**Tabla 3.2:** Metabolitos Secundarios utilizados en el presente estudio.

Metabolito	PubChem	Codificación
$\beta$ -Caroteno	5280489 <sup>198</sup>	BCT
Kaempferol	5280863 <sup>199</sup>	KPF
Licolcalcona-A	5318998 <sup>200</sup>	LCA
Naringenina	932 <sup>201</sup>	NRG
Quercetina	5280343 <sup>202</sup>	QCT

Protein Data Bank con el código 7JRA<sup>194,195</sup> y su identificador de UniProt P01375. La proteína se hallaba en forma de trímeros, por lo que se seleccionó la que estaba más completa, sin embargo, faltaban los residuos desde 74G al 80S los cuales se completaron con el servidor Modeller.

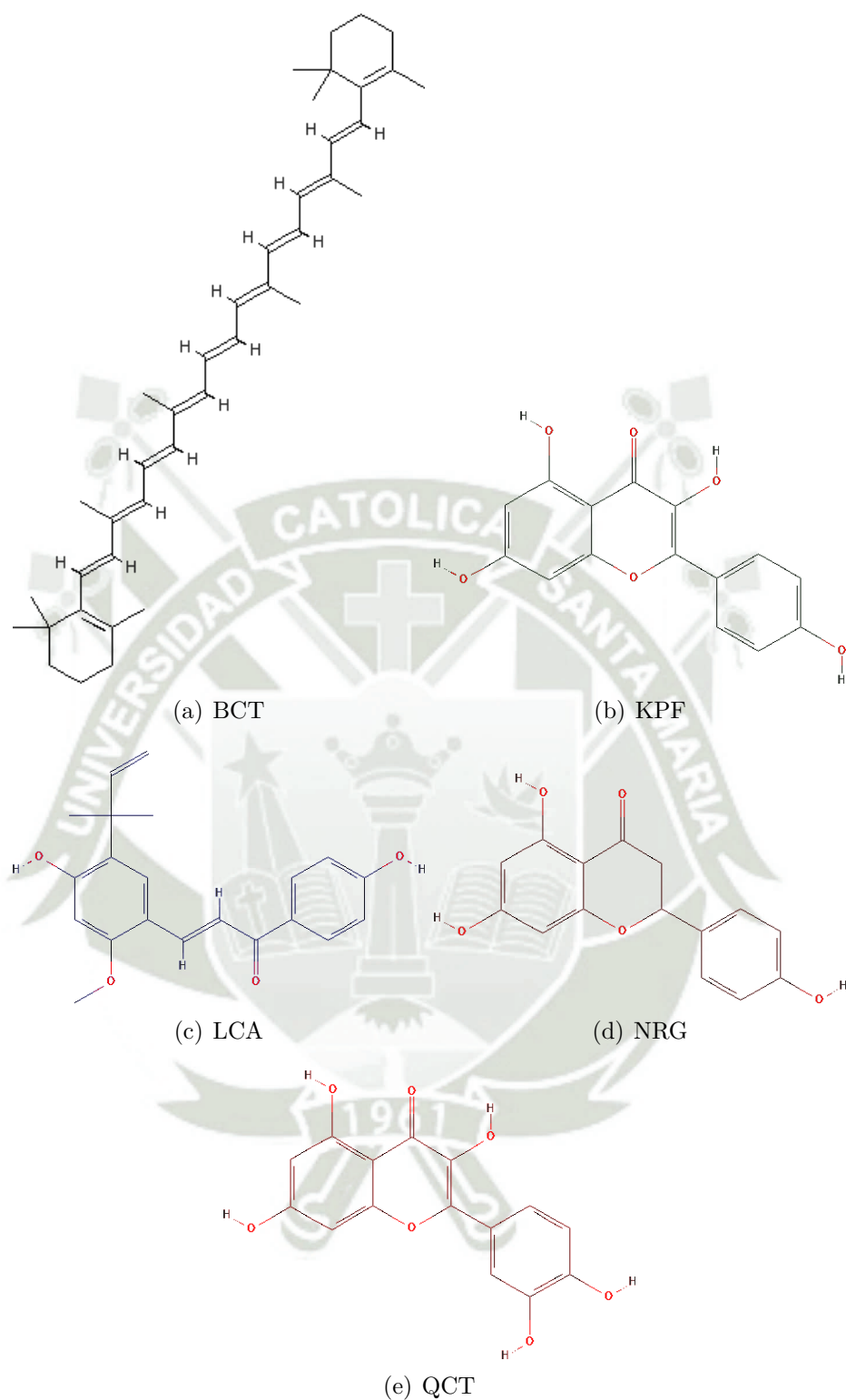
Finalmente se buscó a la TP53 en el servidor de Protein Data Bank, la estructura hallada tenía el código de 4HJE<sup>196,197</sup> y su identificador de UniProt es P04637. Al revisar la estructura se encontró que estaba en forma de tetrámeros y todas las estructuras estaban completas; así que se seleccionó la primera.

Las estructuras secundarias iniciales de las proteínas AKT1, ALB, IL6, TNF y TP53 se presentan en la figura 3.1, las cuales fueron completadas en las que se requería mediante el servidor Modeller. Cabe enfatizar que, en todos los casos, las secuencias de las proteínas que se expresan y se reportan en el servidor Protein Data Bank, no consideran los segmentos presentes en las pre-proteínas ya que ellos no se hallan involucradas en la proteína funcional.

En la tabla 3.2, presentamos los diversos metabolitos secundarios que utilizamos en el presente estudio, su código de acuerdo con el servidor PubChem y la codificación que le hemos dado a cada metabolito secundario en nuestra investigación.

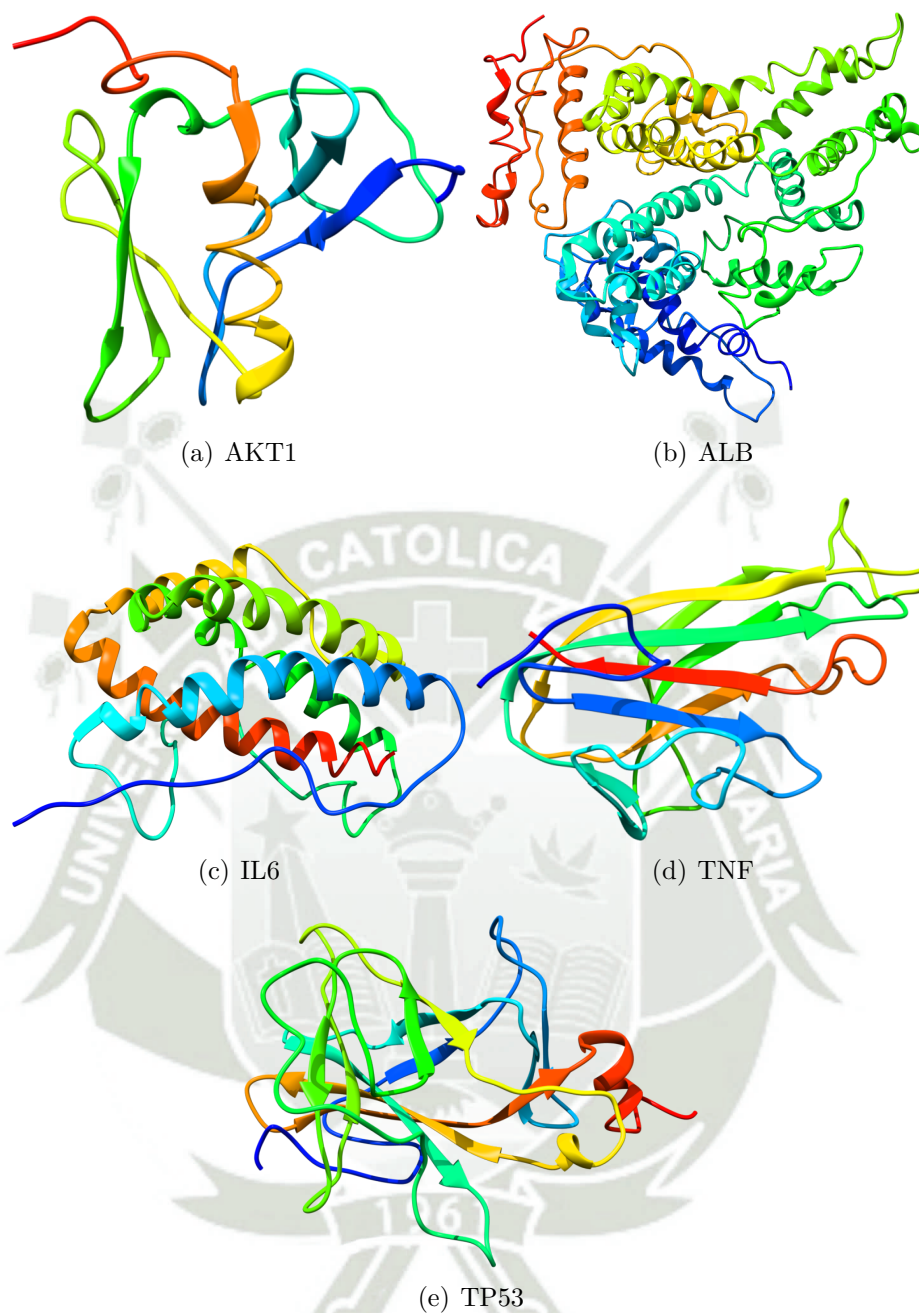
En la figura 3.2 se presentan las estructuras 2D extraídas de la base de datos de PubChem de los metabolitos secundarios  $\beta$ -Caroteno(BCT), Kaempferol(KPF), Licolcalcona-A(LCA), Naringenina(NRG) y Quercetina(QCT)

Las estructuras en tres dimensiones de las cinco proteínas utilizadas en el presente estudio se muestran en la figura 3.3, donde podemos apreciar las estructuras finales



**Figura 3.2:** Estructuras 2D de los Metabolitos secundarios.

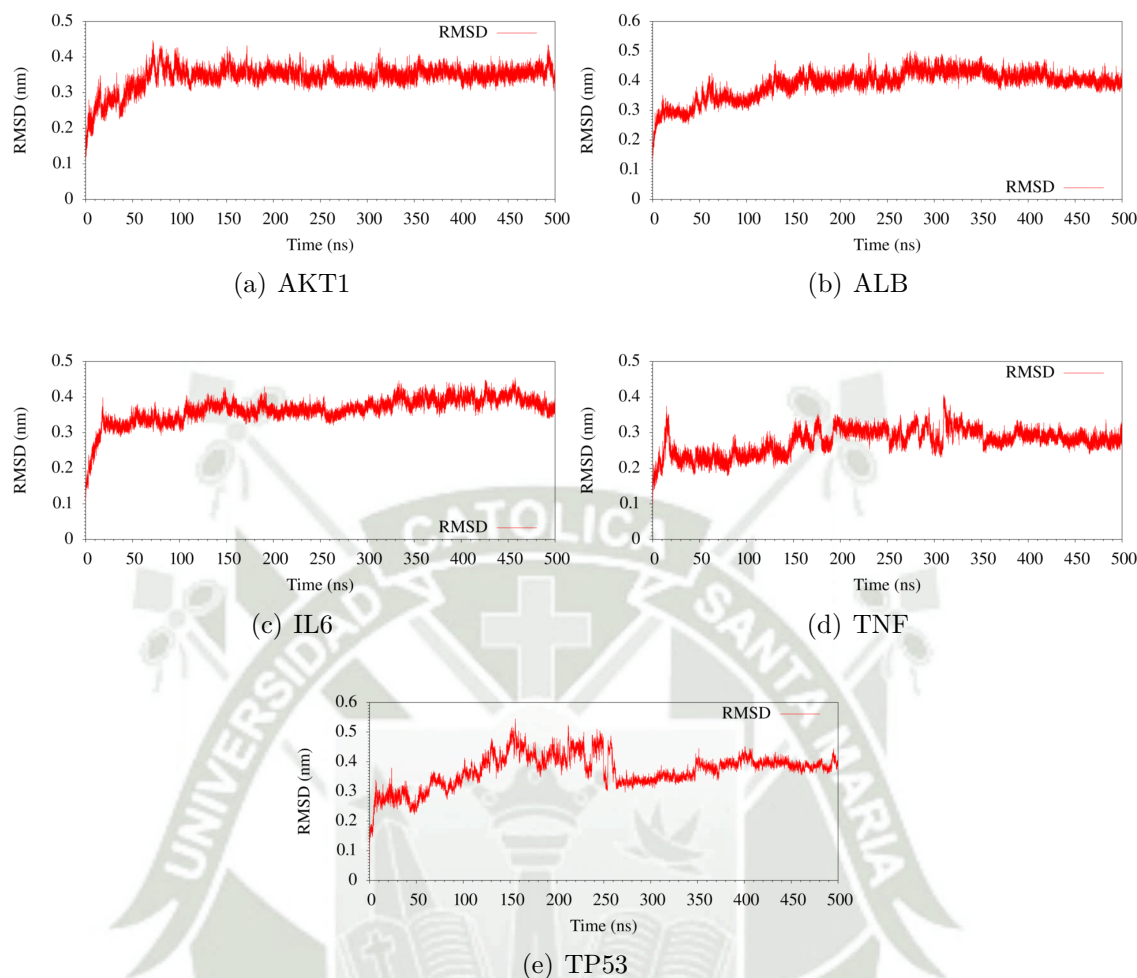
después de haberles realizado una trayectoria de 500ns bajo una ensamble Isobárico – Isotérmico (NPT), en casi todos los casos, las estructuras secundarias se han conservado, por lo que los datos adicionales de este análisis en el servidor PDBSum se



**Figura 3.3:** Estructuras de las proteínas equilibradas 500ns.

muestran en los anexos B.1 al B.5. Así mismo, se realizó un análisis del diagrama de Ramachandran con el mismo servidor, y no hemos encontrado una mayor diferencia respecto a las estructuras de partida, como se puede apreciar en los anexos C.1 al C.5.

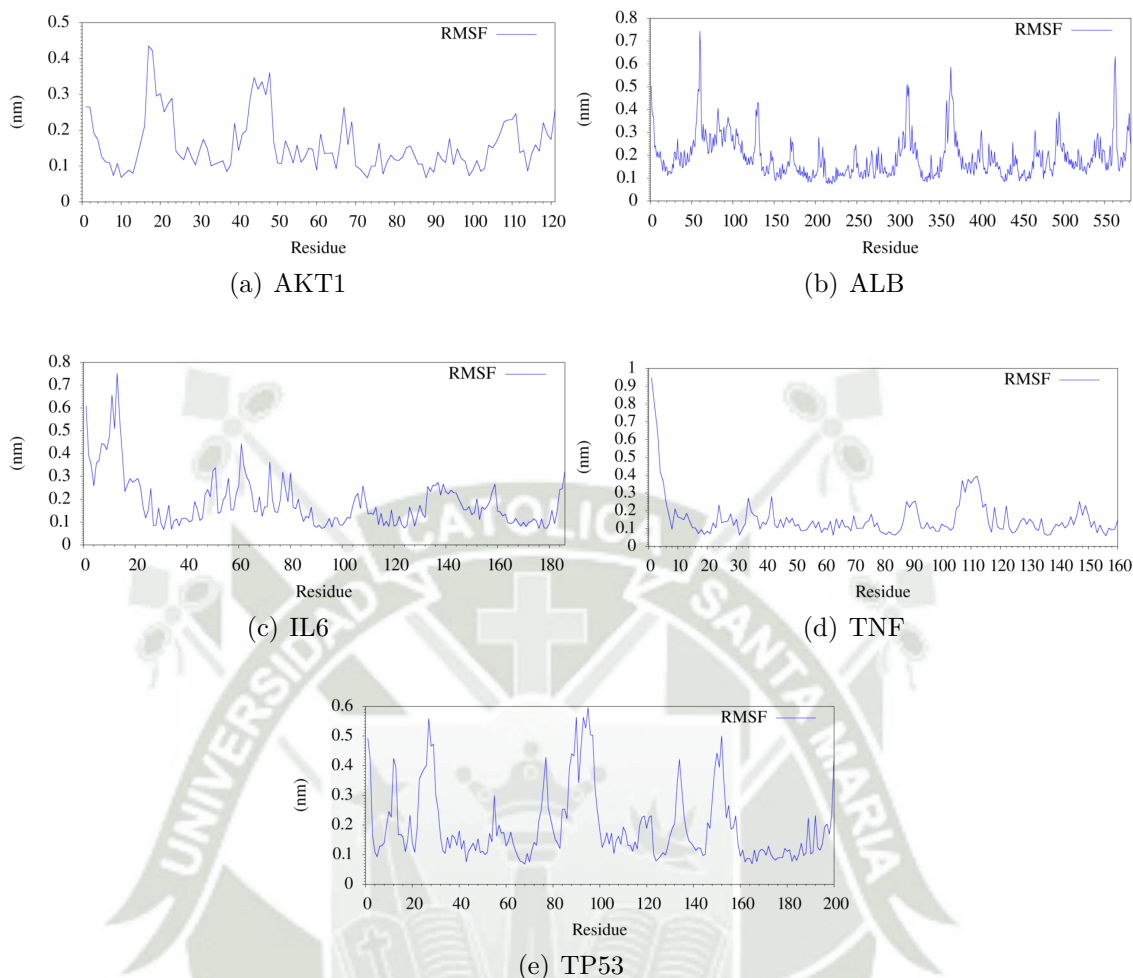
Seguidamente hemos realizado un análisis de la estabilidad durante la trayectoria de nuestros sistemas, para ello hemos generado gráficas de la raíz media cuadrática de las distancias (RMSD), como se puede apreciar en la figura 3.4. En el caso de



**Figura 3.4:** Raíz Media Cuadrática de las Distancias (RMSD) de los sistemas Proteicos.

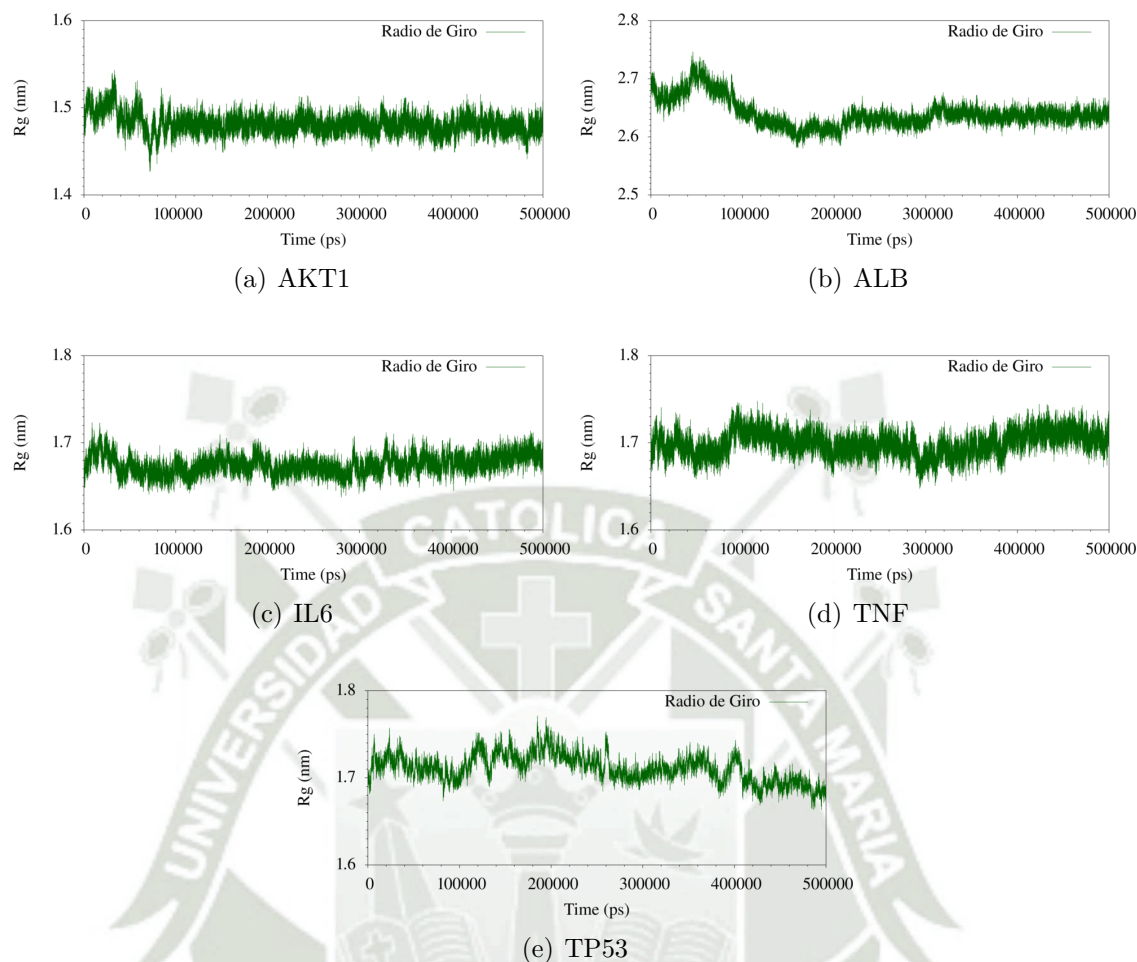
la proteína AKT1 se puede apreciar que alcanzó la estabilidad aproximadamente a los 100ns (ver figura 3.4(a)), y respecto a su variación podemos observar que se encuentra entre 0.28 y 0.45nm. Así mismo la ALB alcanzó su estabilidad a partir de los 150ns en un rango entre 0.35 y 0.49nm como se observa en la figura 3.4(b). De igual manera la proteína IL6 alcanzó su estabilidad a partir de los 100ns, pero en un intervalo de 0.31 y 0.46nm (ver figura 3.4(c)); también la TNF se estabilizó aproximadamente partir de los 350ns entre los 0.22 y los 0.35nm (ver figura 3.4(d). Por otro lado, la proteína TP53 se volvió estable desde los 260ns en el rango de 0.29 y 0.45nm como se puede apreciar en la figura 3.4(e).

Seguidamente, se realizó el análisis de las fluctuaciones medias cuadráticas, para todos los sistemas proteicos del presente estudio, como podemos apreciar en la



**Figura 3.5:** Raíz Media Cuadrática de la Fluctuación (RMSF) de los sistemas Proteicos.

figura 3.5. De la figura 3.5(a), se desprende que la región de mayor fluctuación se halla entre los residuos 15 al 22, así como en la región del 40 al 50, en las demás regiones, se aprecia una fluctuación moderada, normal de un proceso de simulación molecular. Por otra parte, en la figura 3.5(b) se puede evaluar que existen múltiples fluctuaciones que se hallan en múltiples regiones que son desde los residuos del 1 al 4, 55 al 65, 125 al 135, 300 a 330, 355 a 380 y 560 a 570. Mientras tanto para el resto de las regiones la fluctuación que se observa es moderada. Igualmente se puede analizar en la figura 3.5(c) se desprende tres regiones de mayores fluctuaciones estas se hallan entre los residuos 1 al 4, 5 al 16 y del 58 al 66, el resto de las fluctuaciones son normales como parte del proceso de la simulación molecular. En la figura 3.5(d) se distingue una región de mayor fluctuación que se encuentra entre



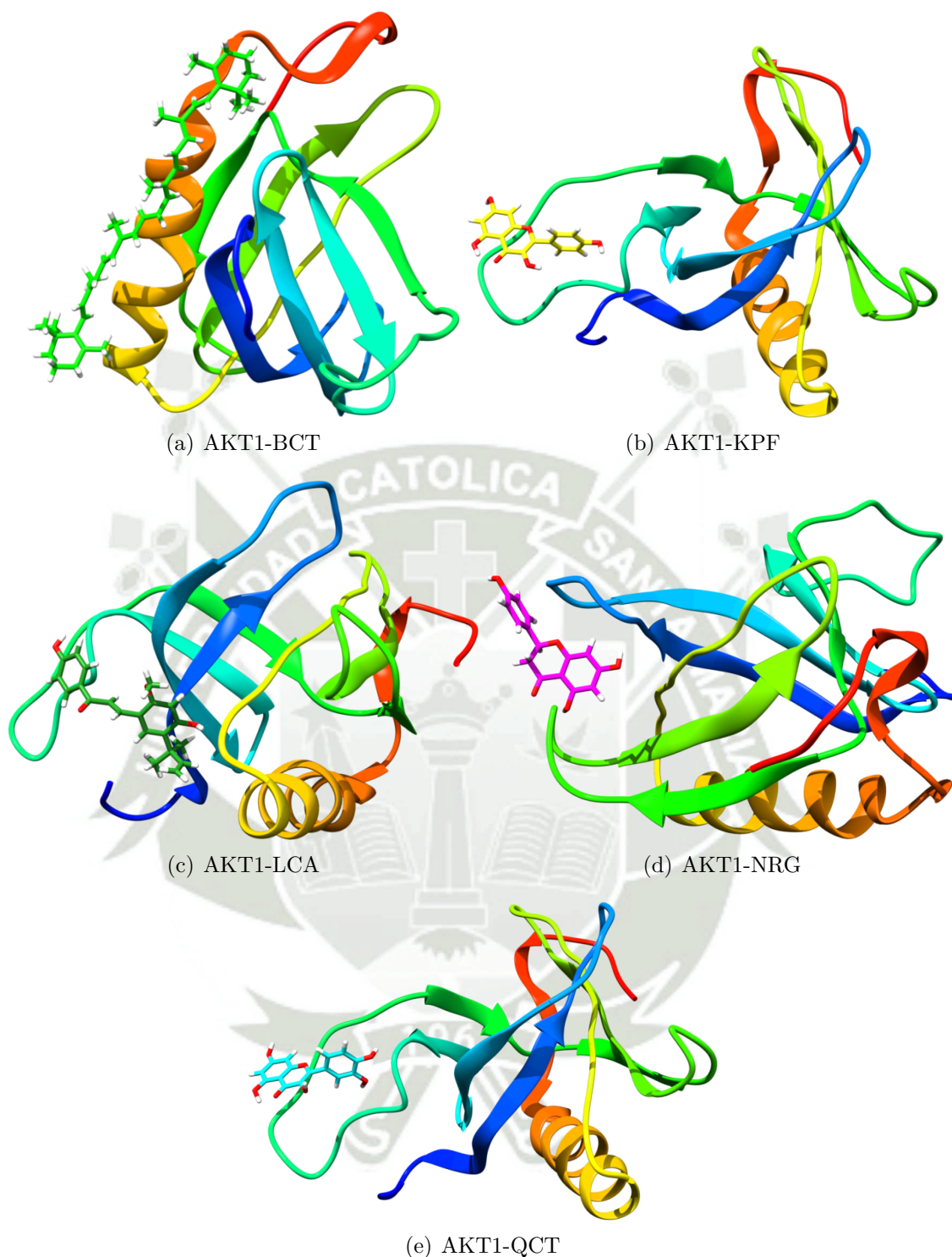
**Figura 3.6:** Radio de giro de los sistemas Proteicos.

los residuos 1 al 7, el resto de las regiones muestran una fluctuación moderada. Así mismo, se distinguen en la figura 3.5(e) numerosas regiones de grandes fluctuaciones estas están comprendidas entre los residuos 1 al 4, 5 al 17, 21 al 34, 70 al 82, 83 al 101, 125 al 141 y 144 al 160; mientras que el resto de las regiones poseen fluctuaciones son moderadas. Adicionalmente, hemos analizado el radio de giro para cada uno de nuestros sistemas durante el proceso de simulación (ver figura 3.6), en ella se puede apreciar que en el caso de la AKT1 a partir de los 100ns podemos observar que se ha llegado a una estabilización y con una posterior fluctuación constante (ver figura 3.6(a)). Por otro lado, la ALB comenzó a compactarse desde los 50ns aproximadamente y se mantiene fluctuando hasta que llega a poco más de los 200ns que mantiene una estabilización hasta que aproximadamente a los 320ns tiene un corto periodo de descompactación, sin embargo, recupera su estabilidad con una fluctua-

ción constante(ver figura 3.6(b)). De igual manera en la IL6 se aprecia que es a partir de los 100ns que se puede observar como que es que se estabiliza conservando una fluctuación constante(ver figura 3.6(c)). El caso de la TNF es diferente ya que muestra una estabilidad desde los 100ns, pero es a partir de los 300ns que la proteína se comienza a descompactar poco a poco hasta que en la última parte de la dinámica vuelve compactarse(ver figura 3.6(d)). Por el contrario, la TP53 no muestra una estabilidad constante, sino que a partir de los 200ns se aprecia un comportamiento de compactación(ver figura 3.6(e)).

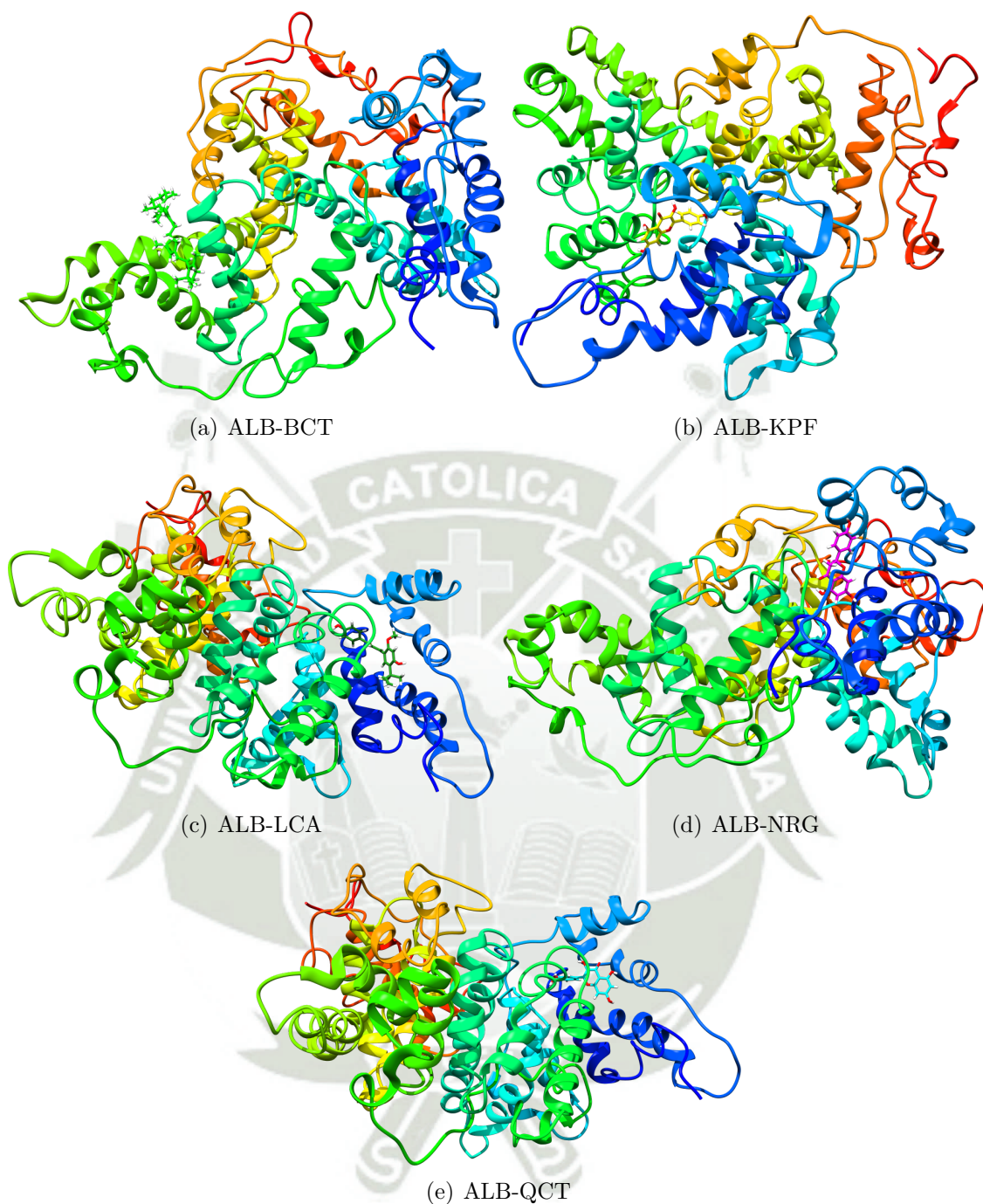
Para el proceso de la generación de las estructuras interactuantes, se realizó un conjunto de 1000 eventos utilizando el programa AutoDock Vina, para cada uno de los sistemas, de los mil eventos, solamente se ha seleccionado el sistema de menor energía para utilizarlo como entrada para un nuevo proceso de simulación molecular durante una trayectoria de 100ns. Es importante recordar que, para cada uno de los sistemas proteicos, se ha realizado el mismo proceso con las cinco biomoléculas de interés para la presente investigación. De este modo, en la figura 3.7 podemos observar, las cinco biomoléculas o metabolitos secundarios, interactuando con la AKT1. Así entonces, apreciamos que en el caso del BCT este tiene una preferencia estructural cerca de la región del  $\alpha$ -hélice (ver figura 3.7(a)), mientras que en el caso del KPF tiene una afinidad con la zona de la horquilla  $\beta$  de la proteína como se aprecia en la figura 3.7(b). Hay que mencionar, además que la LCA presenta una interacción más favorable en el área entre una lámina  $\beta$  y una parte de la  $\alpha$  hélice (ver figura 3.7(c)). Así mismo, la NRG también tiene una preferencia estructural en el área entre dos horquillas  $\beta$  y una lámina  $\beta$  tal y como se aprecia en la figura 3.7(d). Con respecto a la QCT, esta muestra una interacción preferente a la región la horquilla  $\beta$  (ver figura 3.7(e)).

Así mismo, para la ALB se puede observar su interacción con los cinco metabolitos secundarios en la figura 3.8. De tal manera que se muestra que el BCT tiene una preferencia estructural principalmente con tres  $\alpha$  hélices (ver figura 3.8(a)).



**Figura 3.7:** Acoplamiento molecular de la AKT1 con los metabolitos secundarios.

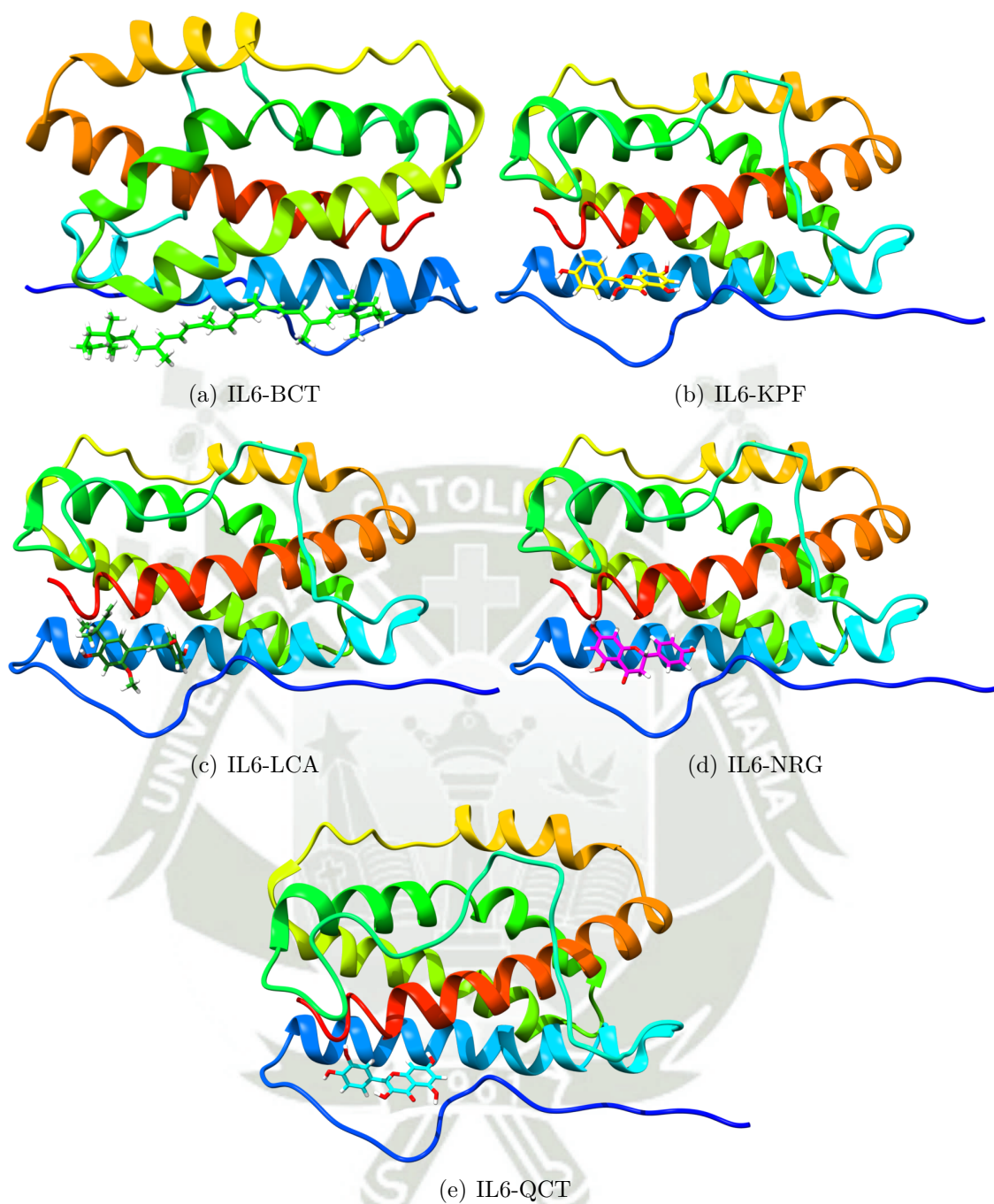
Igualmente, el KPF tiene afinidad con la zona próxima a dos  $\alpha$  hélices y a unas secciones de los giros  $\beta$  como se aprecia en la figura 3.8(b); mientras que para la LCA se observa que tiene una afinidad estructural en el área adyacente a tres  $\alpha$  hélices y los giros  $\beta$  (ver figura 3.8(c)).



**Figura 3.8:** Acoplamiento molecular de la ALB con los metabolitos secundarios.

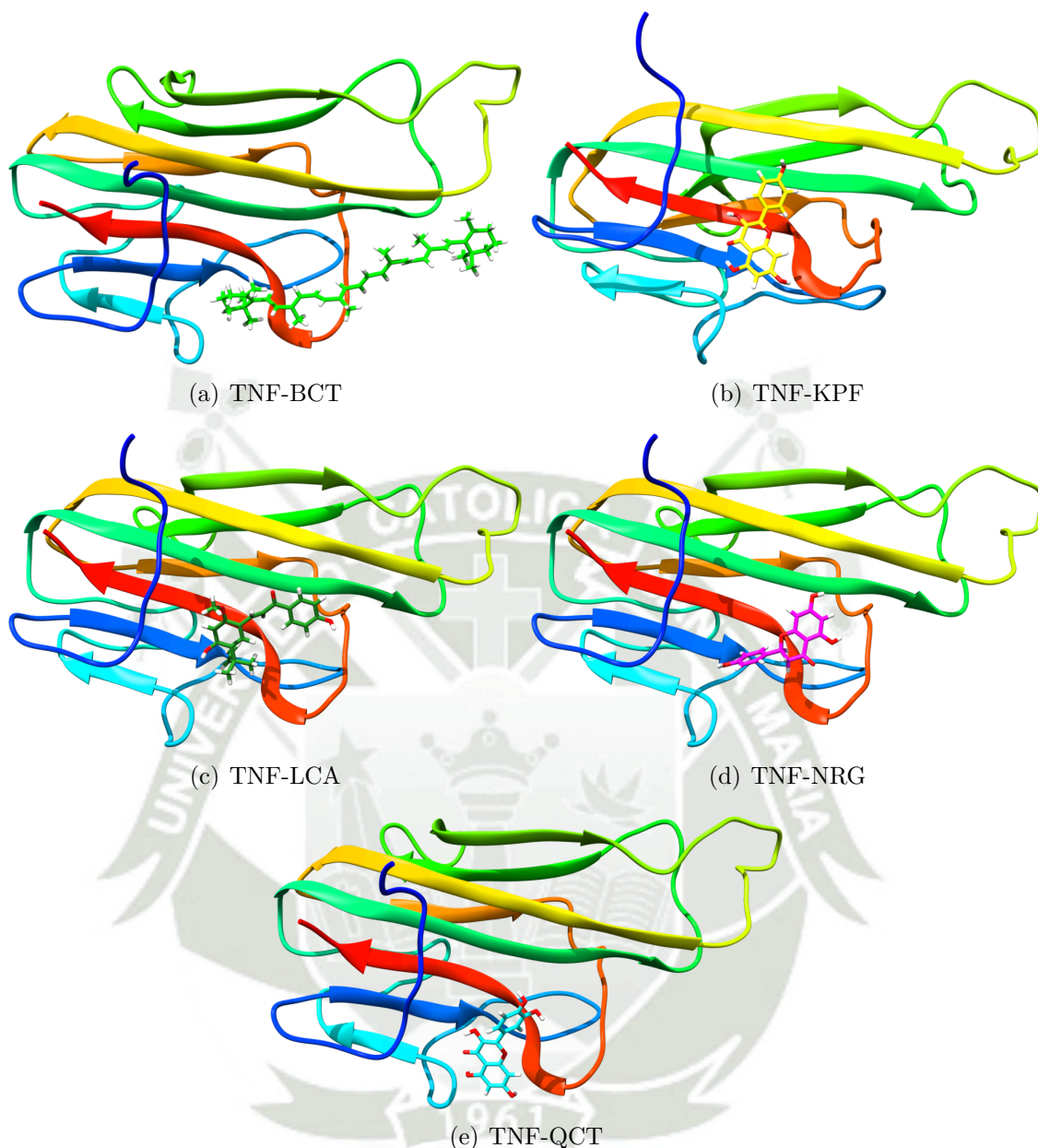
Por otra parte, en el caso de la NRG esta mantiene cierta preferencia principalmente por la región entre tres  $\alpha$  hélices como se puede distinguir en la figura 3.8(d); además para la QCT se analiza que tiene interacción en el sector de dos  $\alpha$  hélices y tres partes de los giros  $\beta$  de la proteína (ver figura 3.8(e)).

En cuanto a la IL6 se observa en la figura 3.9 sus interacciones con las cinco biomoléculas. De este modo se puede apreciar el BCT tiene una afinidad cerca de



**Figura 3.9:** Acoplamiento molecular de la IL6 con los metabolitos secundarios.

la zona entre dos  $\alpha$  hélices (ver figura 3.9(a)), también se observa en la figura 3.9(b) cómo es la interacción más favorable para el KPF que es en la región los giros  $\beta$  y una  $\alpha$  hélice de la proteína. Además, la LCA tiene una preferencia estructural cercana a los giros  $\beta$  y una pequeña sección de dos  $\alpha$  hélices (ver figura 3.9(c), asimismo para la NRG se observa que tiene su interacción en el área de los giros  $\beta$  y la  $\alpha$  hélice tal y como se distingue en la figura 3.9(d). Igualmente, para la QCT se



**Figura 3.10:** Acoplamiento molecular de la TNF con los metabolitos secundarios.

observa cómo es que su interacción de preferencia es cerca de la  $\alpha$  hélice y los giros  $\beta$  (ver figura 3.9(e)).

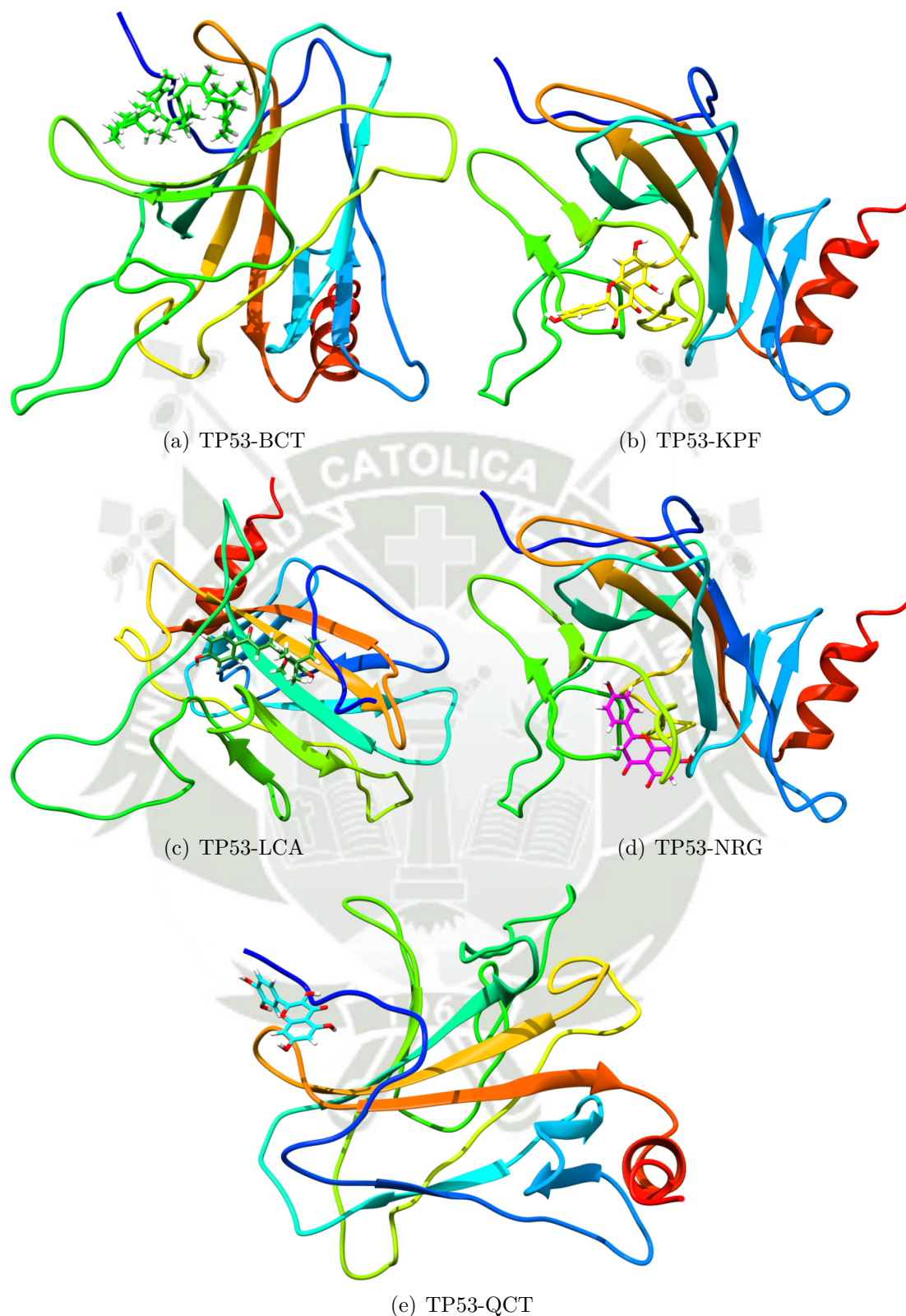
Es en la figura 3.10 donde se muestra a la TNF con sus interacciones con cada uno de los cinco metabolitos secundarios. Entonces se puede apreciar que en el caso del BCT existe una interacción en la zona de dos láminas  $\beta$  y giros  $\beta$  y  $\gamma$  de la proteína (ver figura 3.10(a)). Así mismo, para el caso del KPF este muestra una preferencia estructural con la región de los giros  $\beta$  y partes de las láminas  $\beta$  como se enseña en la figura 3.10(b); de la misma manera ocurre para la LCA que posee una afinidad

por sección de las láminas  $\beta$  (ver figura 3.10(c). Por otra parte, como se observa en la figura 3.10(d) la NRG tiene una afinidad en la región de las láminas  $\beta$  y cercana a giros  $\beta \gamma$ , mientras que la QCT tiene una preferencia principalmente la zona de los giros  $\beta$  y las láminas  $\beta$  la proteína(ver figura 3.10(e))

Por otra parte, para el caso de la TP53 se muestra sus interacciones con las cinco biomoléculas en la figura 3.11. Entonces para el BCT se analiza que tiene una preferencia por la zona de las láminas  $\beta$  de la proteína (ver figura 3.11(a)), también para el KPF se aprecia en la figura 3.11(b) que tiene una interacción en la región de dos láminas  $\beta$  y un giro  $\beta$ . Con respecto a la LCA se puede observar que tiene una afinidad en el área la horquilla  $\beta$  y el giro  $\beta$  y una parte de la lámina  $\beta$  de la proteína (ver figura 3.11(c). Por otro lado, en la figura 3.11(d) se aprecia la sección por la que es preferente la NRG que es cercana a dos láminas  $\beta$ ; además la QCT tiene una preferencia estructural en la región de la horquilla  $\beta$  y próxima al giro  $\beta$  (ver figura 3.11(e).

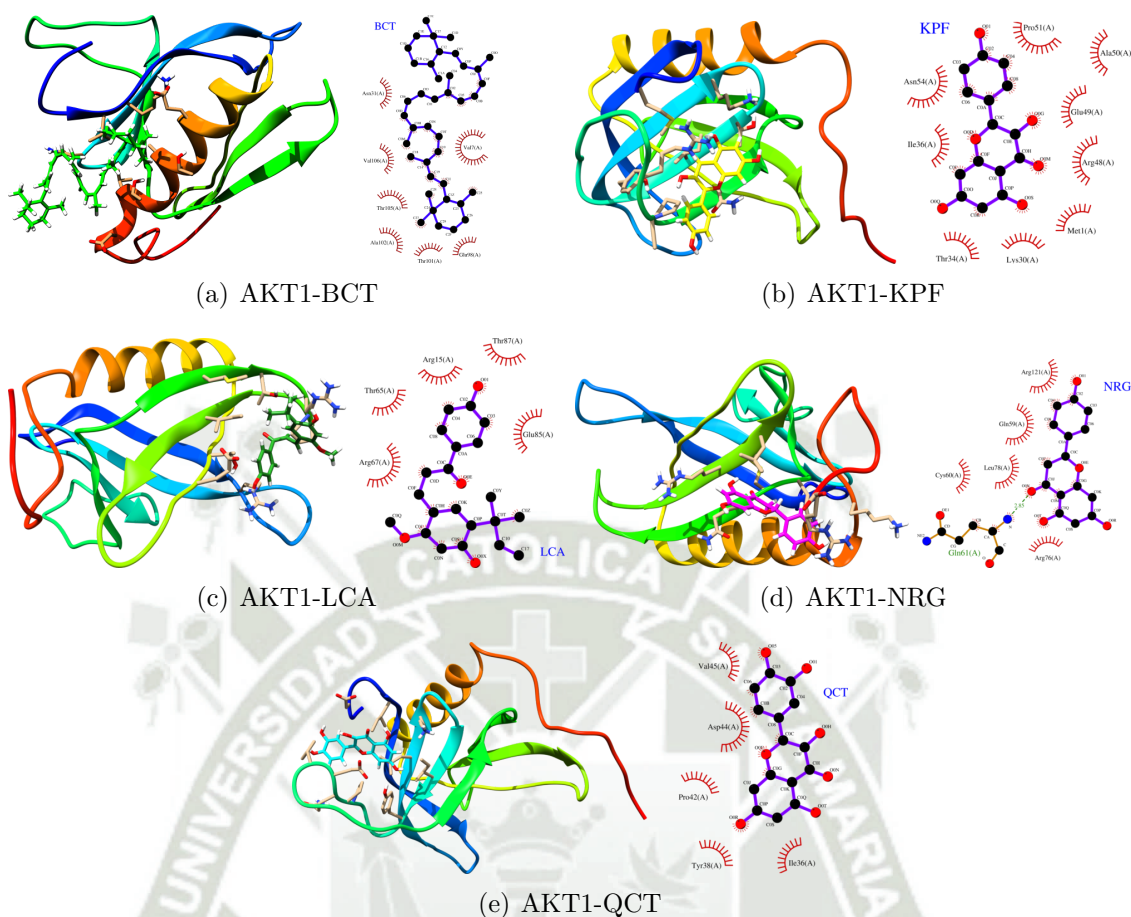
En todos los casos luego de proceder a las mil repeticiones para cada uno de los acoplamientos, *docking*, seleccionamos al sistema de menor energía para cada caso, en otras palabras, los sistemas más estables. A cada uno de los sistemas seleccionados, se procedió a realizar de acuerdo con la metodología, una simulación de dinámica molecular por un periodo de tiempo de 100ns, a condiciones fisiológicas.

Los resultados de la simulación molecular en la región de equilibrio para el caso de las interacciones con la AKT1 y las cinco biomoléculas se presentan en la figura 3.12. Cuando analizamos para el caso del BCT, desde la figura tridimensional y el diagrama de LigPlot (ver figura 3.12(a)), observamos que los aminoácidos que presentan una interacción son la Val7, Asn31, Glu98, Thr101, Ala102, Thr105 y la Val106. De manera similar para el KPF se aprecia gracias a la figura tridimensional y su esquema de LigPlot (ver figura 3.12(b)) que los residuos con los que interacciona son la Met1, Lvs30, Thr34, Ile36, Arg48, GLu49, Ala50, Pro51 y la Asn54. En cambio, en el caso de la LCA al evaluar su modelo tridimensional y su gráfica de LigPlot



**Figura 3.11:** Acoplamiento molecular de la TP53 con los metabolitos secundarios.

(ver figura 3.12(c)) se observa que solo tiene interacción con los aminoácidos Arg15, Thr32, Arg67, Glu85 y la Thr87; mientras que para el metabolito NRG al analizar



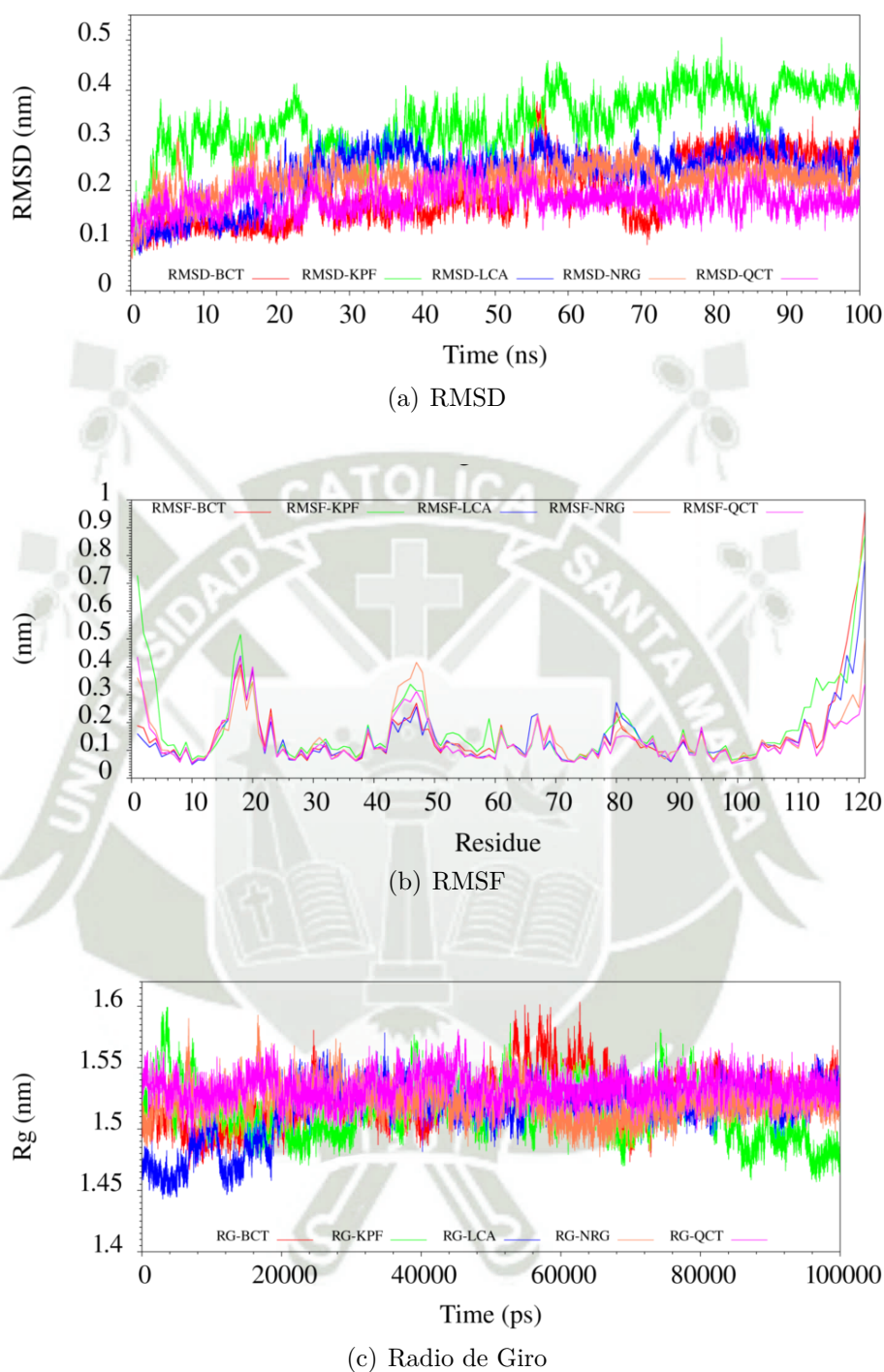
**Figura 3.12:** Dinámicas moleculares de los complejos con AKT1.

su figura tridimensional y el esquema de LigPlot (ver figura 3.12(d)) apreciamos que a los residuos con los que tiene una interacción son la Gln59, Cys60, Gln61, Arg76, Leu78 y la Arg121; cabe resaltar que es con la Gln61 con la genera un enlace de hidrógeno. Por otra parte, en el caso de la QCT al momento de observar su modelo tridimensional y su diagrama de LigPlot (ver figura 3.12(e)) distinguimos como es que interacciona con los aminoácidos Ile36, Tyr38, Pro42, Asp44 y la Val45. Teniendo en cuenta los diferentes aminoácidos con los que interactúa cada biomolécula, el número interacciones totales que presenta cada metabolito es el siguiente: para BCT es siete (07), para KPF es nueve (09), para LCA es cinco (05), para NRG es seis (06) y para QCT es cinco (05); siendo el KPF el que presenta más interacciones y la NRG la única que presenta un enlace de hidrógeno.

Se realizaron diferentes análisis de la estabilidad estructural para los resultados generados por la simulación de dinámica molecular de la proteína AKT1 con los cinco

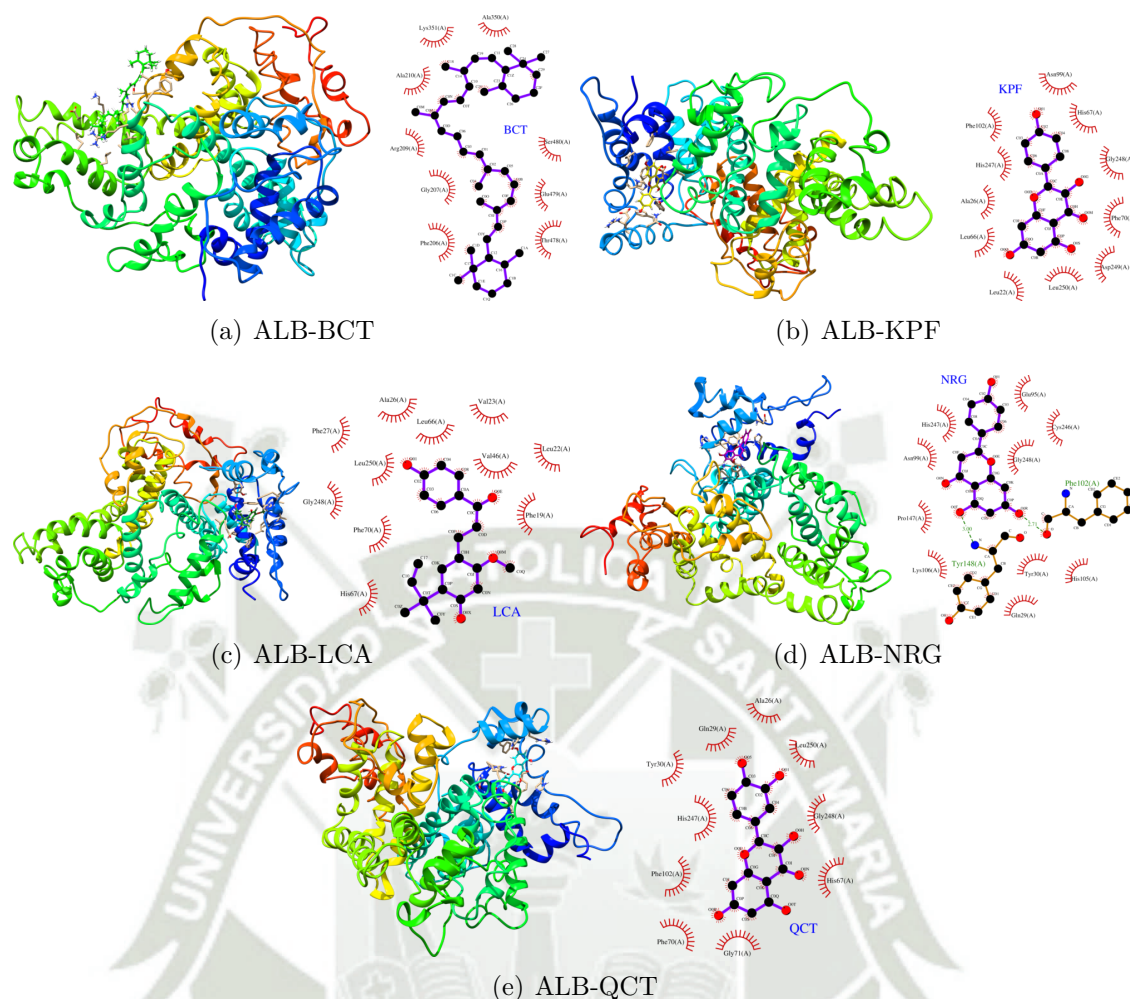
metabolitos (ver figura 3.13). En la figura 3.13(a) se muestra la gráfica de la raíz media cuadrática de las distancias (RMSD). En el caso con el BCT se puede apreciar que alcanzó la estabilidad aproximadamente a los 75ns, respecto a su variación podemos observar que se encuentra entre 0.19 y 0.35nm. Así mismo con el KPF alcanzó su estabilidad a partir de los 88ns en un rango entre 0.19 y 0.35nm. De igual manera con la LCA alcanzó su estabilidad a partir de los 40ns, pero en un intervalo de 0.2 y 0.35nm; también con la NRG se estabilizó aproximadamente partir de los 75ns entre los 0.16 y los 0.27nm. Por otro lado, con la QCT se volvió estable desde los 56ns en el rango de 0.11 y 0.25nm. Se realizó el análisis de fluctuaciones de medias cuadráticas (RMSF) como se aprecia en la figura 3.13(b), se desprende que la región que fluctúa más al momento de interactuar con los metabolitos se halla entre los residuos 42 al 50, donde es con la NRG que tiene la fluctuación más alta en comparación con las fluctuaciones con el BCT y la LCA. Otra diferencia es en la región del 110 al 115 donde es con el KPF el único que varía más; en las demás regiones, se aprecia una fluctuación moderada, normal de un proceso de simulación molecular. Adicionalmente, hemos analizado el radio de giro para cada uno de nuestros resultados de la dinámica molecular con la AKT1 con los cinco metabolitos (ver figura 3.13(c)), en ella se puede apreciar que en el caso del BCT se muestra una descompactación cerca a los 50ns hasta los 70ns para luego continuar mostrando un comportamiento estable. Por otro lado, con el KPF se muestra una compactación desde los 70ns hasta el final, en el caso de la LCA, esta muestra una estabilidad aproximadamente a partir de los 20ns. No obstante, la NRG y QCT muestran un comportamiento estable desde el inicio de la dinámica con una posterior fluctuación constante.

En la figura 3.14 se presentan los resultados de la simulación de dinámica molecular en la región de equilibrio para todas las interacciones de la ALB con los cinco metabolitos secundarios. Al examinar el caso del BCT, se evidencia desde su figura tridimensional y su esquema de LigPlot (ver figura 3.14(a)) que los residuos que par-



**Figura 3.13:** Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la AKT1.

participan en su interacción son la Phe206, Gly207, Arg209, Ala210, Ala350, Lys351, Thr478, Glu479 y la Ser480. Del mismo modo, en el caso del KPF se observa en su representación tridimensional junto a su diagrama de LigPlot (ver figura 3.14(b)) que esté interactúa con los aminoácidos la Leu22, Ala26, Leu66, His67, Phe70, Asn99,

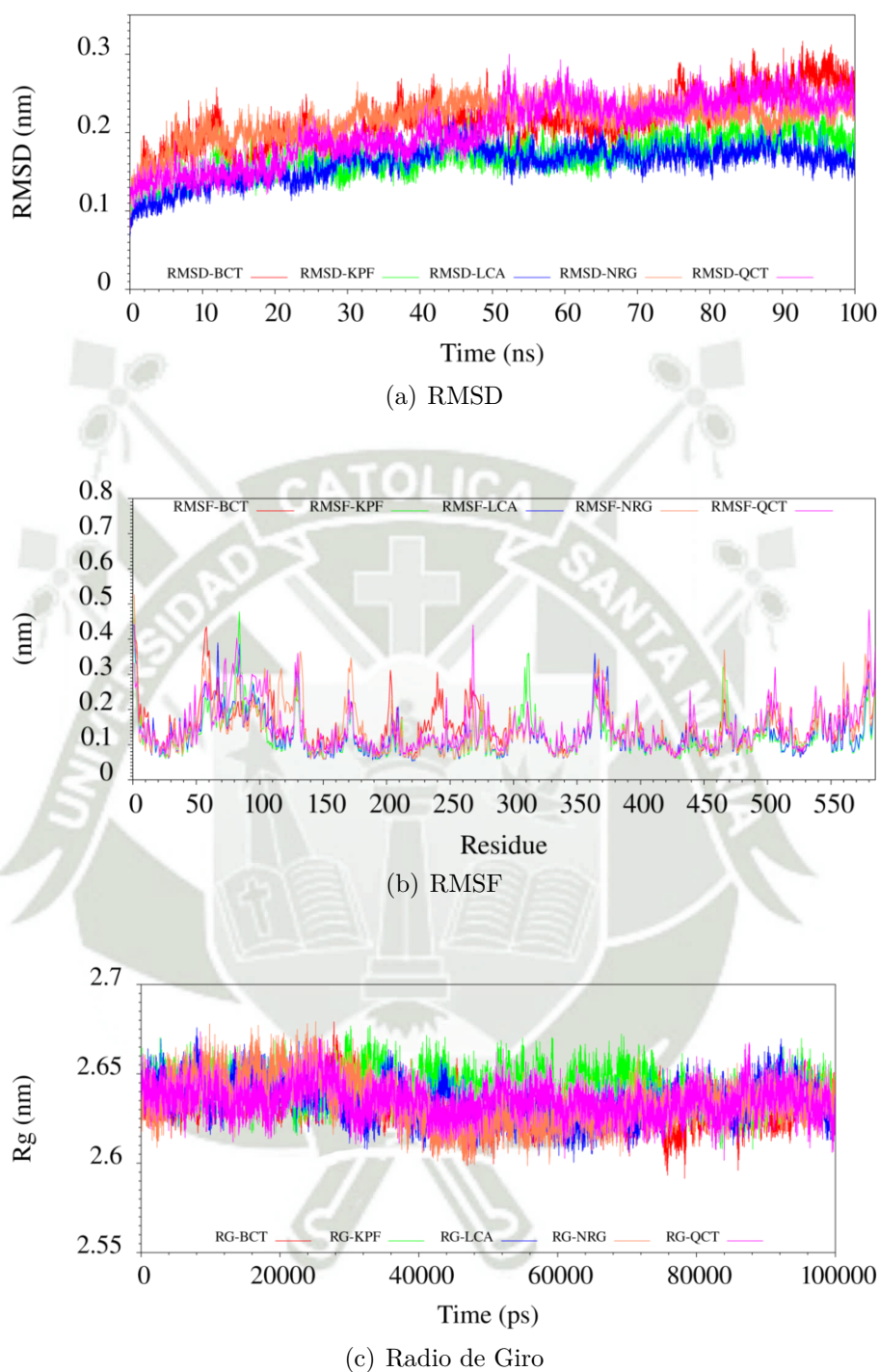


**Figura 3.14:** Dinámicas moleculares de los complejos con ALB.

Phe102, His247, Gly248, Asp249 y la Leu250. En contraste, al analizar a la LCA mediante su modelo tridimensional y su gráfica de LigPlot (ver figura 3.14(c)), se aprecia que solo presenta interacciones con los residuos la Phe19, Leu22, Val23, Ala26, Phe27, Val46, Leu66, His67, Phe70, Gly248 y la Leu250. Respecto a la NRG, observamos en su figura tridimensional y su esquema de LigPlot (ver figura 3.14(d)) que los residuos vinculantes son la Gln29, Tyr30, Glu95, Asn99, Phe102, His105, Lys106, Pro147, Tyr148, Cys246, His247 y la Gly248; donde destaca la Phe102 y la Tyr148 ya que son los que establecen un enlace de hidrógeno. Por otro lado, al analizar el modelo tridimensional y el diagrama de LigPlot de la QCT (ver figura 3.14(e)), se distingue que interactúa con los aminoácidos la Ala26, Gln29, Tyr30, His67, Phe70, Gly71, Phe102, His247, Gly248 y la Leu250. Al considerar los distintos residuos con los que cada uno de los metabolitos secundarios entablan alguna

relación, el número total de interacciones para cada biomolécula es el siguiente: para el BCT son nueve (09), para el KPF son once (11), para la LCA son once (11), para la NRG son doce (12) y para la QCT son diez (10). Es importante señalar que la NRG es el metabolito con la mayor cantidad de interacciones, y es el único que logra formar dos enlaces de hidrógeno.

Se realizaron diversos análisis de la estabilidad de los resultados obtenidos mediante la simulación de dinámica molecular de la ALB en presencia de las cinco biomoléculas (ver figura 3.15). En la figura 3.15(a), se presenta el gráfico de la raíz media cuadrática de las distancias (RMSD). En el caso con el BCT, se observa que logró la estabilidad aproximadamente desde los 2ns; en relación con su variabilidad, se puede notar que se sitúa en el intervalo de 0.12 a 0.31nm. De manera similar, con el KPF, la estabilidad se alcanzó a partir desde los 5ns, manteniéndose en un rango entre 0.09 y 0.25nm. Asimismo, con la LCA, se logró la estabilidad desde los 28ns, pero con una variación en el intervalo de 0.13 a 0.23nm. También, con la NRG, la estabilización se evidenció aproximadamente a partir de los 30ns, con valores entre 0.18 y 0.27nm. Por otro lado, en el caso con la QCT, la estabilidad se estableció a partir de los 60ns, dentro del rango de 0.21 a 0.30nm. Por otra parte, el análisis de las fluctuaciones medias cuadráticas (RMSF) se analiza en la figura 3.15(b) se puede evaluar que existen múltiples fluctuaciones en las que existe una diferencia significativa entre las que se hallan en múltiples regiones que son desde los residuos del 55 al 65, donde la gran diferencia existe primero para el BCT y luego para la NRG; 125 al 135, la gran diferencia está para la NRG; 155 al 165, nuevamente es la NRG la que tiene una mayor diferencia; 225 al 265, es el con BCT y con el QCT donde se genera una fluctuación significativa; al 300 a 330, en esta región solo es con el KPF el que tiene la mayor diferencia. Mientras tanto para el resto de las regiones la fluctuación que se observa es moderada. Por otro lado, se analizó el radio de giro para las simulaciones de la ALB con las cinco biomoléculas (ver figura 3.15(c)). En este caso con los cinco metabolitos se mantiene la estabilidad con una fluctuación



**Figura 3.15:** Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la ALB.

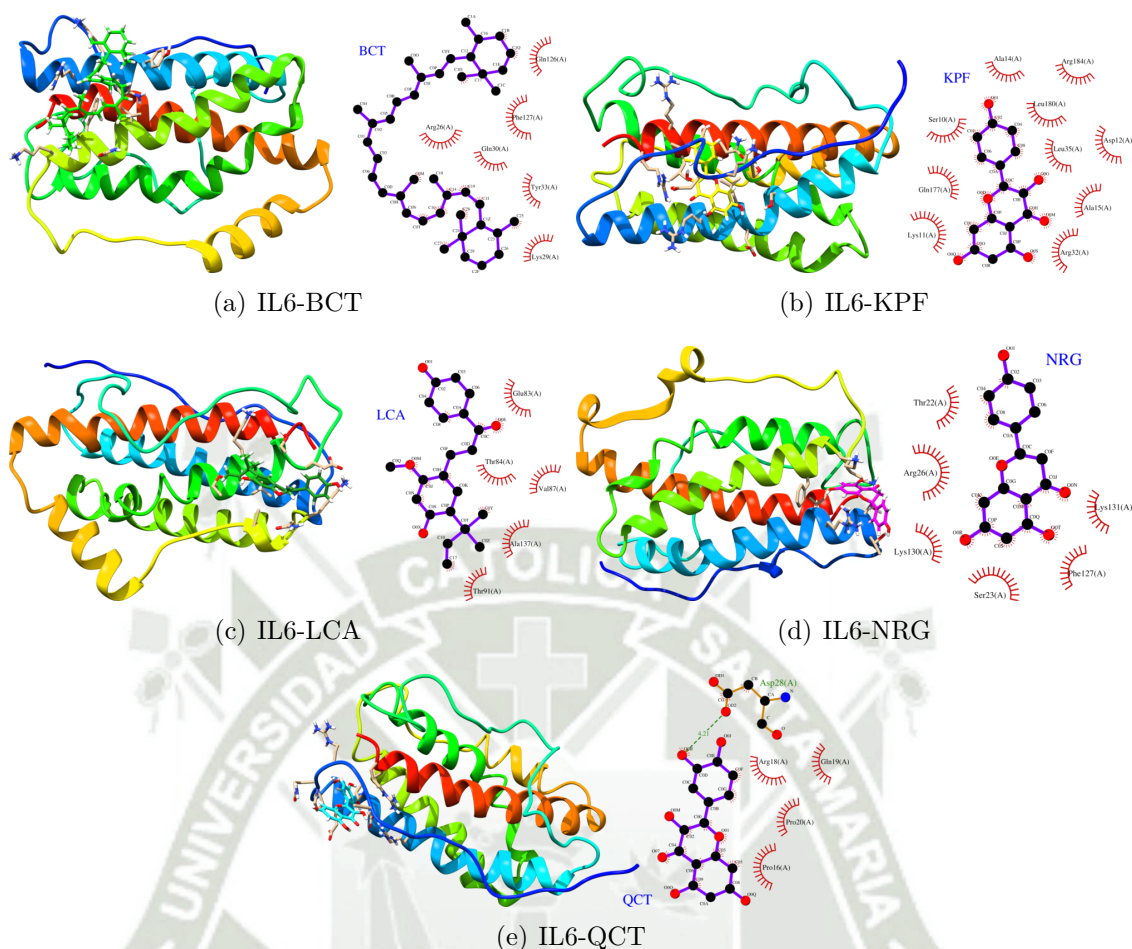
constante.

Las interacciones resultantes de la IL6 con las cinco biomoléculas después de la simulación molecular en la región de equilibrio se muestran en la figura 3.16. Con respecto al análisis del BCT observamos que en la representación tridimensional y

el esquema de LigPlot (ver figura 3.16(a)) los aminoácidos implicados en las interacciones son la Arg26, Lys29, Gln30, Tyr33, Gln126 y la Phe127. Similarmente en el caso del KPF es a través de su modelo tridimensional y su diagrama de LigPlot (ver figura 3.16(b)) en el que se constata su interacción con los siguientes residuos la Ser10, Lys11, Asp12, Ala14, Ala15, Arg32, Leu35, Gln177, Leu180 y la Arg184. En cambio, para la LCA mediante su figura tridimensional y su gráfica de LigPlot (ver figura 3.16(c)), se observa que solo genera una interacción con los aminoácidos que son la Glu83, Thr84, Val87, Thr91 y la Ala137. Con respecto a la NRG, gracias al análisis de su representación tridimensional y su diagrama de LigPlot (ver figura 3.16(d)), se aprecia que los residuos interactuantes son la Thr22, Ser23, Arg26, Phe127, Lys130 y la Lys131. Por último, evaluando el modelo tridimensional junto al esquema de LigPlot de la QCT (ver figura 3.16(e)), podemos distinguir que interactúa con los aminoácidos que son la Pro16, Arg18, Gln19, Pro20 y la Asp28, destacando que el que formó un enlace de hidrógeno fue la Asp28.

Cada metabolito secundario entabla diferentes interacciones con los residuos, sin embargo, el número total de interacciones para cada uno se distribuye de la siguiente forma: para el BCT son seis (06), para el KPF son diez (10), para la LCA son cinco (05), para la NRG son seis (06) y para la QCT son cinco (05); siendo el KPF el que presenta el mayor número de contactos, y la QCT la que formó el único enlace de hidrógeno.

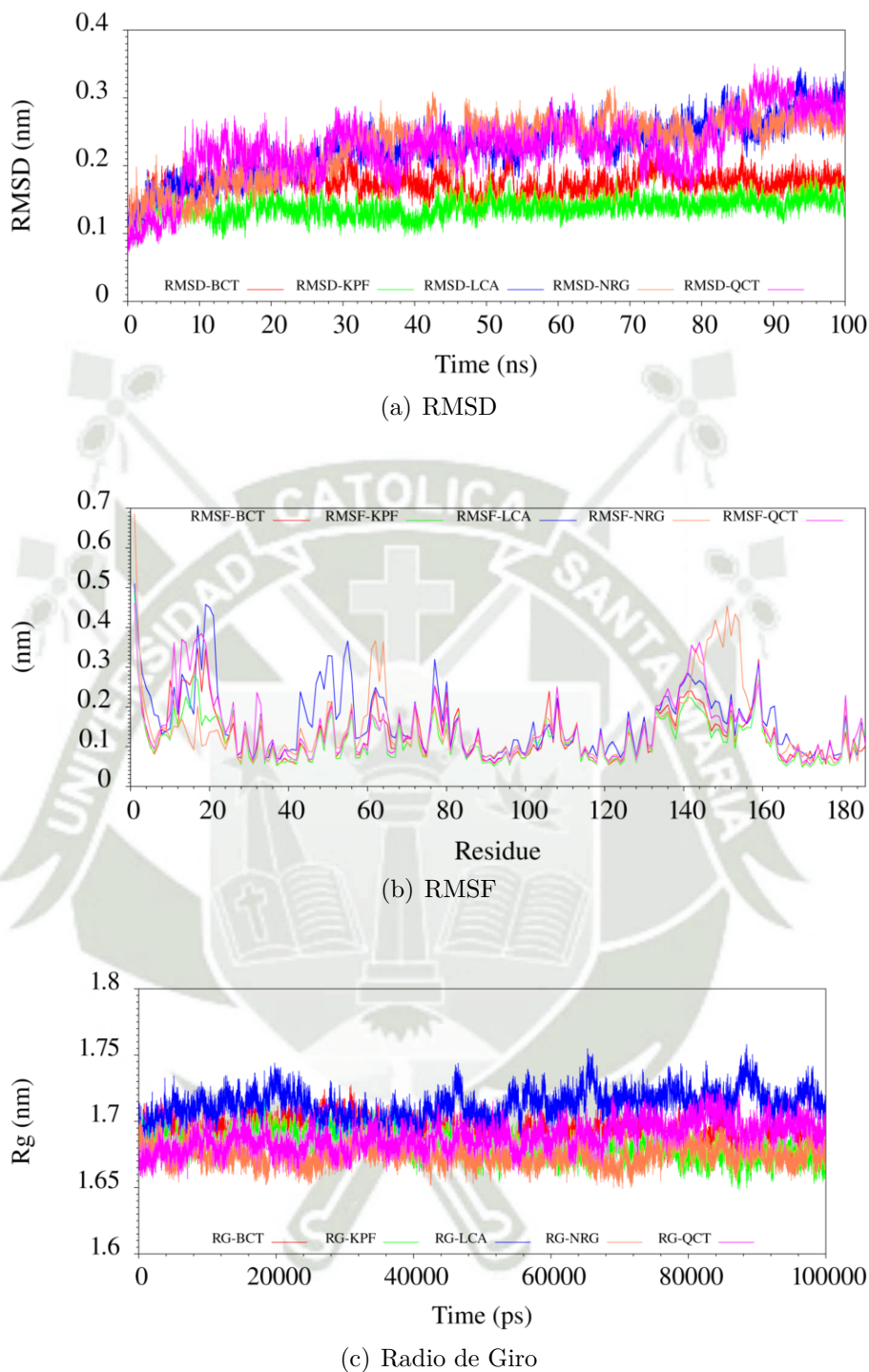
Se llevaron a cabo distintos análisis para evaluar la estabilidad de los resultados generados por la simulación de dinámica molecular de la IL6 en presencia de los cinco metabolitos (ver figura 3.17). La figura 3.17(a) exhibe el gráfico de la raíz media cuadrática de las distancias (RMSD). En cuanto al resultado con el BCT, se evidencia que alcanzó la estabilidad alrededor de los 5ns; respecto a su variación, se puede observar que se encuentra en el rango de 0.11 a 0.25nm. De manera similar, con el KPF, la estabilidad se logró a partir de los 5ns, manteniéndose en un intervalo de 0.08 a 0.19nm. Igualmente, con la LCA, se alcanzó la estabilidad desde los 30ns,



**Figura 3.16:** Dinámicas moleculares de los complejos con IL6.

pero en un intervalo de 0.19 a 0.33nm. También, con la NRG, la estabilización se evidenció aproximadamente a partir de los 45ns, con valores fluctuantes entre 0.18 y 0.31nm. Por otro lado, en el caso de la QCT, la estabilidad se estableció desde los 38ns en el rango de 0.18 a 0.31nm, sin embargo, cerca de los 80ns pierde su equilibrio.

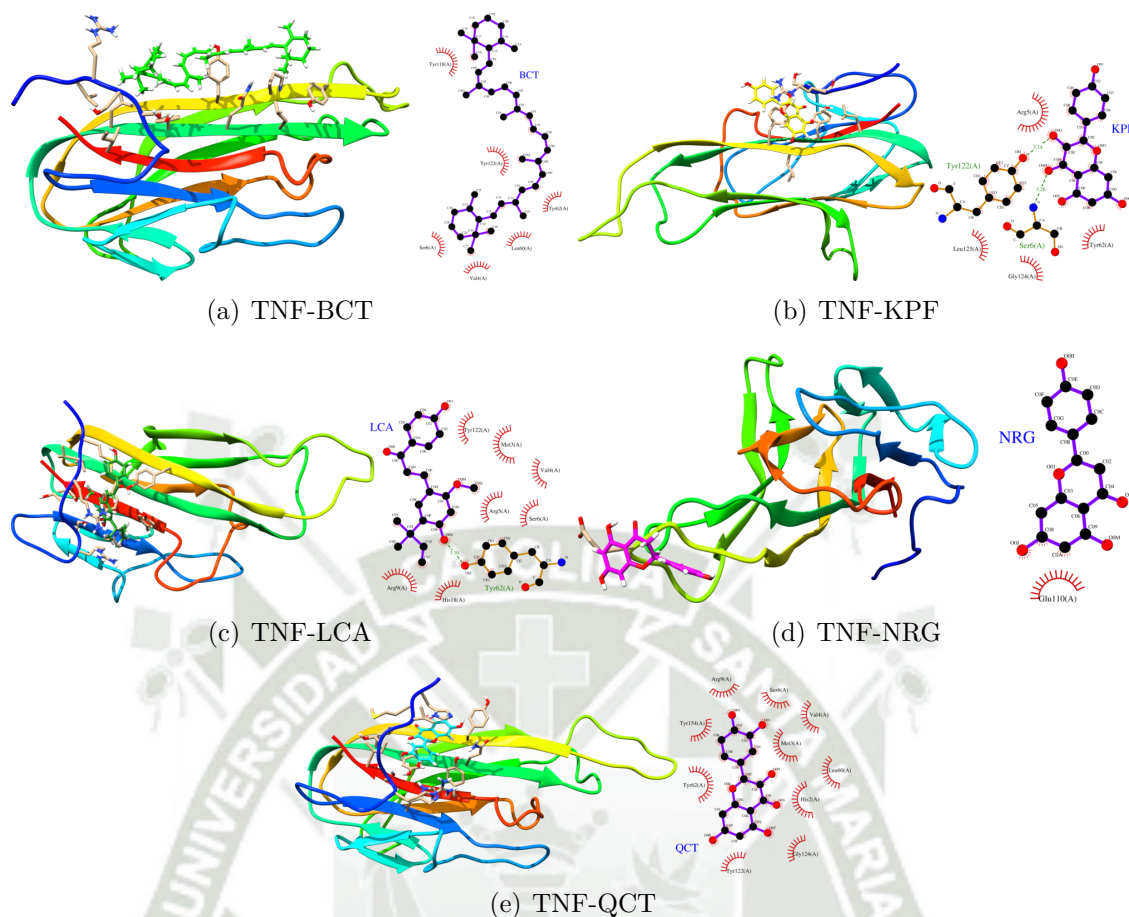
Igualmente se puede observar el análisis de las fluctuaciones medias cuadráticas (RMSF) en la figura 3.17(b), se desprenden cuatro regiones de mayor diferencia en las fluctuaciones, estas se hallan entre los residuos 5 al 25, donde la diferencia más grande existe con la LCA y luego con la QCT; 40 al 55, en esta región es con la LCA donde se presenta las mayor fluctuación; 56 al 65, la NRG presentó una gran diferencia y luego le siguen el BCT y la LCA; 130 a 160, en esta región existe la mayor diferencia especialmente con la NRG y luego para la QCT; el resto de fluctuaciones son normales como parte del proceso de la simulación molecular.



**Figura 3.17:** Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la IL6.

De igual manera, se realizó el análisis del radio de giro para las trayectorias de la IL6 con los cinco metabolitos (ver figura 3.17(c)), donde se aprecia que durante la dinámica la proteína se mantiene estable con fluctuaciones constantes.

Después de la simulación de la dinámica molecular para lograr el equilibrio la



**Figura 3.18:** Dinámicas moleculares de los complejos con TNF.

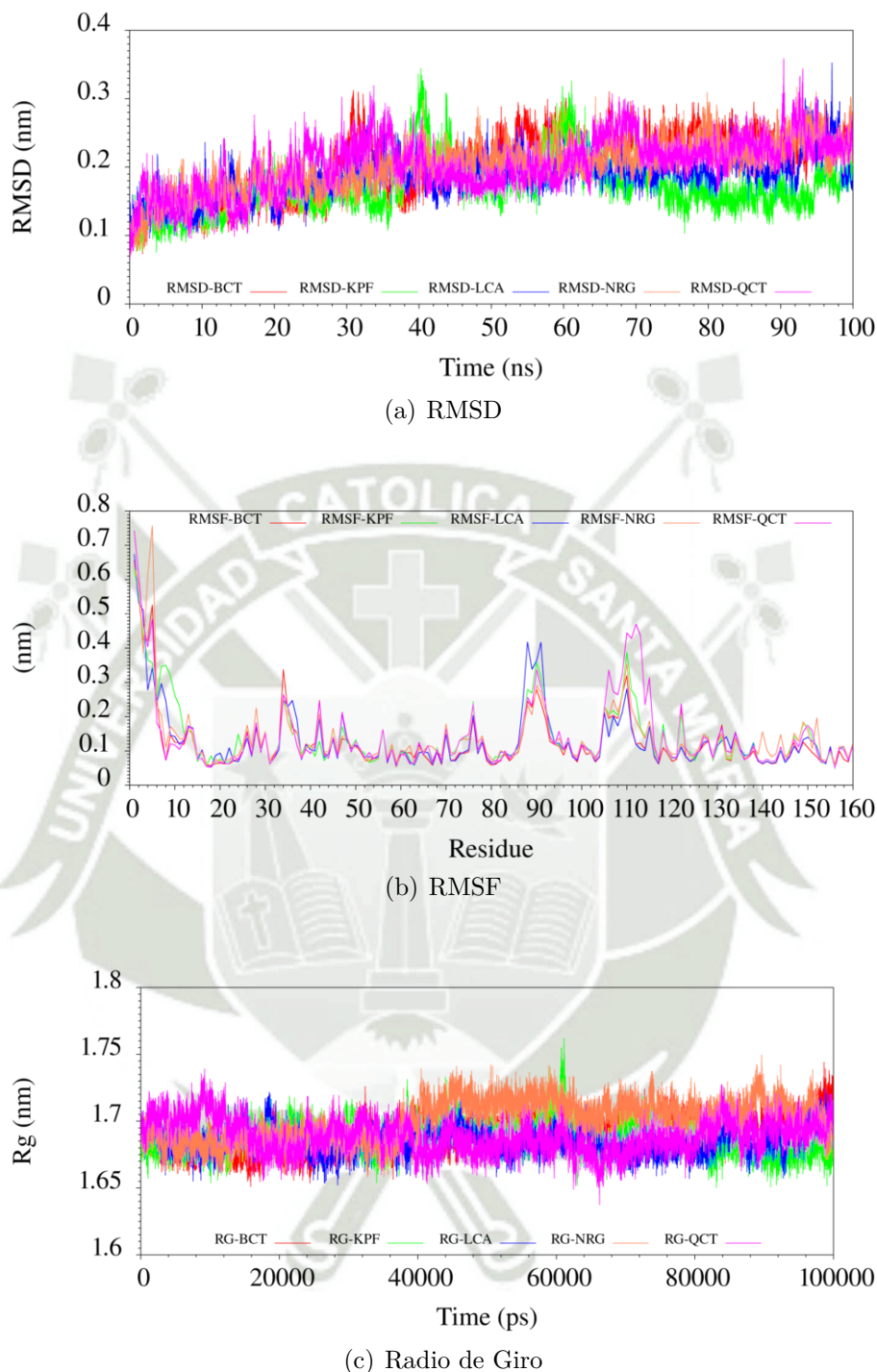
TNF género interacciones con los metabolitos secundarios tal y como se presenta en la figura 3.18. En el caso del BCT se aprecia mediante su figura tridimensional y su diagrama de LigPlot (ver figura 3.18(a)) que los aminoácidos que participan en su interacción son la Val4, Ser6, Leu60, Tyr62, Tyr118 y la Tyr122. Del mismo modo al analizar al KPF, gracias su estructura tridimensional y su gráfica de LigPlot (ver figura 3.18(b)) se pone en evidencia que los residuos con los que interactúa son la Arg5, Ser6, Tyr62, Tyr122, Leu123 y la Gly124; siendo los residuos Ser6 y Tyr122 los que forma dos enlaces de hidrógeno. En cambio, para la LCA al apreciar su modelo tridimensional y su esquema de LigPlot (ver figura 3.18(c)), este solo tiene interacciones con los aminoácidos la Met3, Val4, Arg5, Ser6, Arg9, His18, Tyr62 y la Tyr122; siendo la Tyr62 la única que formó un enlace de hidrogeno. Respecto a la NRG observando su modelo tridimensional y su diagrama de LigPlot (ver figura 3.18(d)), denotamos que solo interacciona con el residuo de la Glu 110. Por

último, para el caso de la QCT, en su figura tridimensional y su gráfica de LigPlot (ver figura 3.18(e)) se observa que tiene interacción con los aminoácidos la His2, Met3, Val4, Ser6, Arg9, Leu60, Tyr62, Tyr122, Gly124 y la Tyr154. Considerando las diversas interacciones de cada biomolécula, el número total que posee cada una es el siguiente: para el BCT son seis (06), para el KPF son seis (06), para la LCA son ocho (08), para la NRG es uno (01) y para la QCT son diez (10); siendo el QCT el que presentó el mayor número de interacciones, y el KPF y la LCA las que formaron enlaces de hidrógeno.

Se realizaron diferentes análisis acerca de la estabilidad de los resultados obtenidos mediante la simulación de dinámica molecular de la TNF con las cinco biomoléculas (ver figura 3.19). En la figura 3.19(a) se presenta la gráfica de la raíz media cuadrática de las distancias (RMSD). En el caso con el BCT, se aprecia que logró la estabilidad aproximadamente a los 40ns; en cuanto a su variabilidad, se observa que se sitúa entre 0.14 y 0.30nm. De manera análoga, con el KPF, la estabilidad se alcanzó a partir de los 70ns, manteniéndose en un rango entre 0.11 y 0.21nm. De igual manera, con la LCA, se logró la estabilidad a partir de los 32ns, pero con una variación en el intervalo de 0.13 a 0.26nm, pero a partir de los 92ns la proteína comienza a perder su estabilidad. También, con la NRG, se estabilizó aproximadamente a partir de los 40ns, con valores entre 0.14 y 0.30nm. Por otro lado, con la QCT, se volvió estable desde los 70ns, en el rango de 0.18 y 0.35nm.

Se aprecia el análisis de las fluctuaciones medias cuadráticas (RMSF) en la figura 3.19(b) se distinguen dos regiones de mayor diferencia en la fluctuación que se encuentra entre los residuos 1 al 7, donde la fluctuación con la NRG es la más notable; 105 al 118, aca es con la QCT donde la fluctuación difiere en comparación al resto; el resto de las regiones muestran una fluctuación moderada.

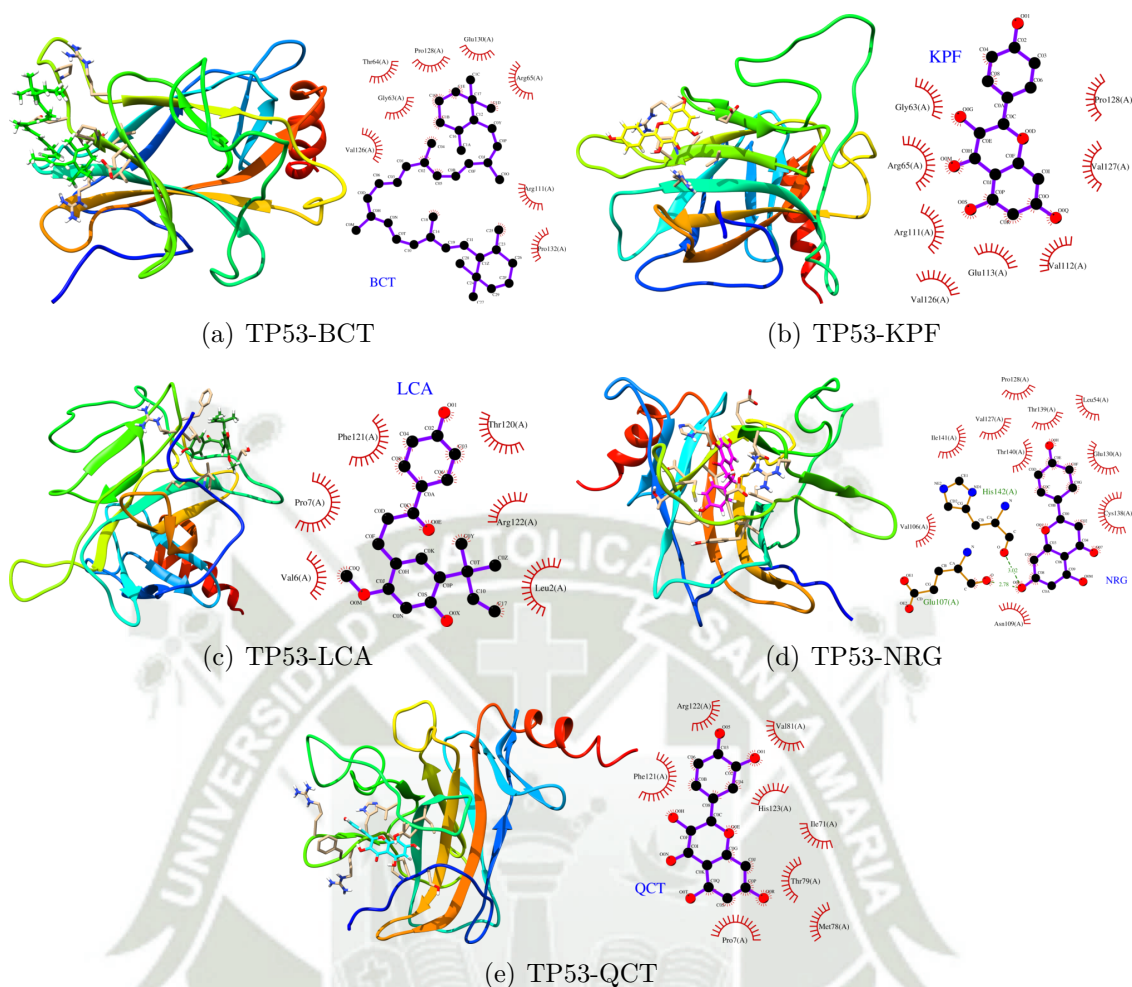
En el caso de la TNF también se hizo el análisis del radio de giro para sus dinámicas con las cinco biomoléculas (ver figura 3.19(c)). Se muestra que con la BCT existe una pequeña descompactación aproximadamente desde los 90ns, mientras que



**Figura 3.19:** Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la TNF.

con la KPF ocurre una compactación desde los 60ns. Además, con la LCA se aprecia una ligera descompactación en los últimos 5ns. Por otro lado, tanto con la NRG como con la QCT se muestra una estabilidad constante.

Los resultados de la dinámica molecular en la región de equilibrio para el caso de



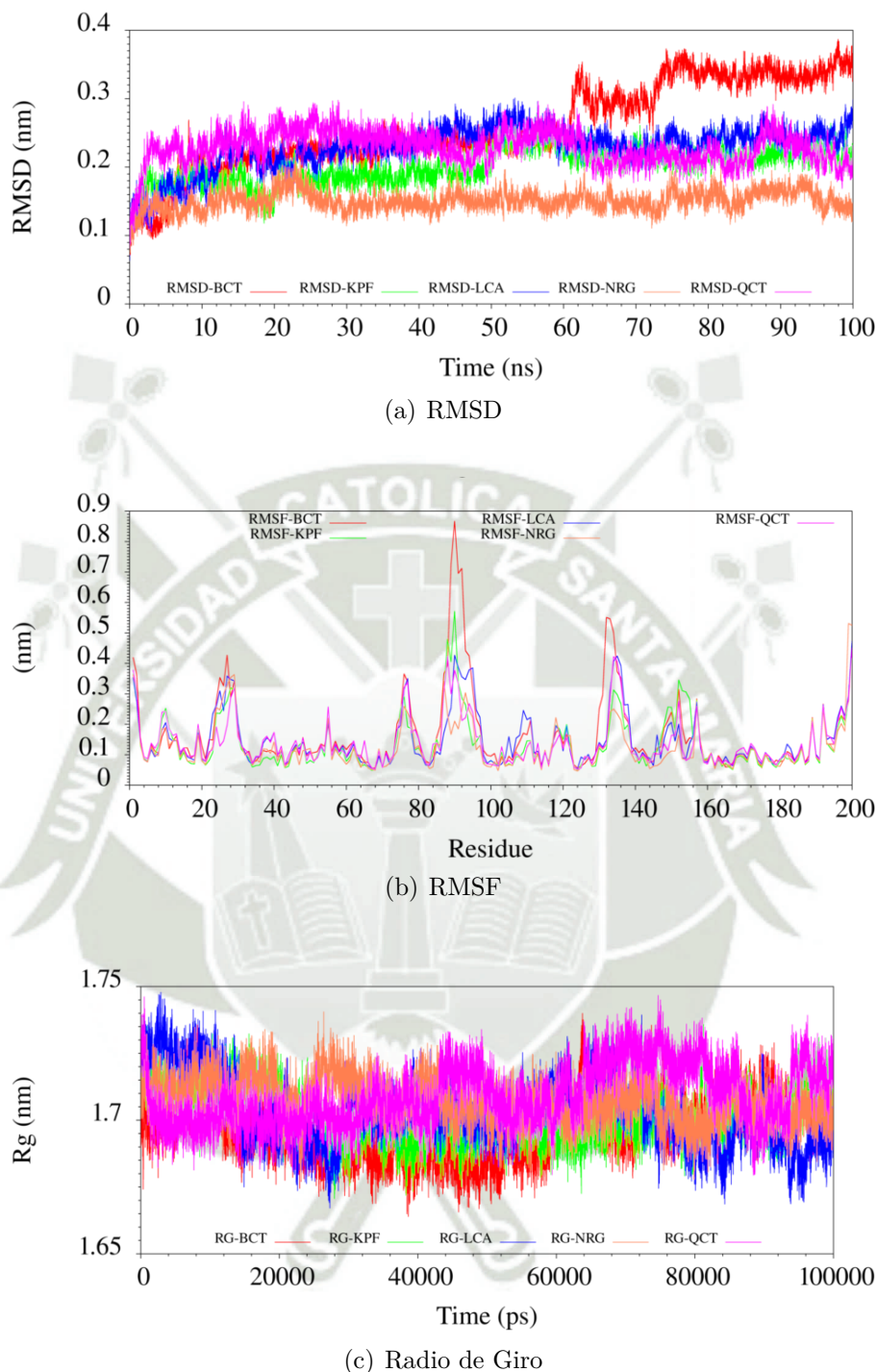
**Figura 3.20:** Dinámicas moleculares de los complejos con TP53.

las interacciones que se generaron con la TP53 y las cinco biomoléculas se presentan en la figura 3.20. Respecto al caso del BCT gracias a la representación tridimensional y el esquema de LigPlot(ver figura 3.20(a)), se observa que los aminoácidos implicados en los contactos son la Gly63, Thr64, Arg65, Arg111, Val126, Pro128, Glu130 y la Pro132. De la misma manera para el KPF al analizar su figura tridimensional y su diagrama de LigPlot (ver figura 3.20(b)), se aprecia que los residuos con los que interacciona son la Gly63, Arg65, Arg111, Val112, Glu113, Val126, Val127 y la Pro128. Además para la LCA se evalúa que en la figura tridimensional junto a la gráfica de LigPlot (ver figura 3.20(c)), que las interacciones ocurren con los aminoácidos: la Leu2, Val6, Pro7, Thr120, Phe121 y la Arg122, mientras que en el caso de la NRG al analizar el modelo tridimensional y el esquema de LigPlot (ver figura 3.20(d)) se encuentra que los residuos responsables de la interacción son la

Leu54, Val106, Glu107, Asn109, Val127, Pro128, Glu130, Cys138, Thr139, Thr140, Ile141 y la His142; siendo la Glu107 y la His142 los que forman enlaces de hidrógeno. Por otro lado, la representación tridimensional y el diagrama de LigPlot para el caso de la QCT (ver figura 3.20(e)), nos muestra que en la interacción los aminoácidos que participan son la Pro7, Ile71, Met78, Thr79, Val81, Phe121, Arg122 y la His123. Por último, gracias a las diferentes interacciones de los metabolitos secundarios podemos decir que el número total de interacciones para cada uno son: para el BCT son ocho (08), para el KPF son ocho (08), para la LCA son seis (06), para la NRG son doce (12) y para la QCT son ocho (08); siendo la NRG el que presentó el mayor número de interacciones y la única que formó enlaces de hidrógeno.

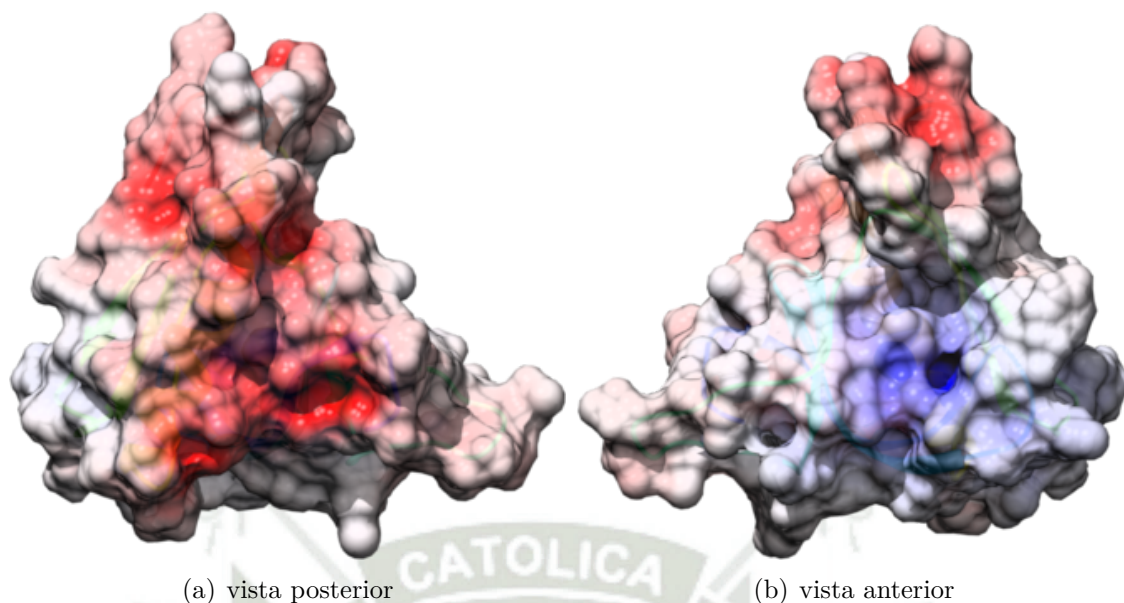
Se efectuaron diversos análisis para evaluar la estabilidad de los resultados generados por la simulación de dinámica molecular de la TP53 con los cinco metabolitos (ver figura 3.21). La figura 3.21(a) muestra el gráfico de la raíz media cuadrática de las distancias (RMSD). En el caso con el BCT, se nota que alcanzó la estabilidad aproximadamente a los 75 ns; en relación con su variación, se puede percibir que se sitúa en el intervalo de 0.19 a 0.35 nm. De igual modo, con el KPF, la estabilidad se logró a partir de los 88 ns, manteniéndose en un rango de 0.19 a 0.35 nm. Asimismo, con la LCA, se alcanzó la estabilidad desde los 40 ns, pero con una variación en el intervalo de 0.2 a 0.35 nm. También, con la NRG, la estabilización se evidenció aproximadamente a partir de los 75 ns, con valores fluctuantes entre 0.16 y 0.27 nm. Por otro lado, con la QCT, se volvió estable desde los 56 ns, en el rango de 0.11 y 0.25 nm.

Así mismo, se distingue el análisis de las fluctuaciones medias cuadráticas (RMSF) en la figura 3.21(b) dos regiones de grandes diferencias en las fluctuaciones, estas están comprendidas entre los residuos 83 al 101, en esta región es la interacción con el BCT la que genera un pico de gran diferencia al resto; y 125 al 141, nuevamente es con el BCT donde se muestra la gran fluctuación; mientras que el resto de las regiones poseen fluctuaciones son moderadas.



**Figura 3.21:** Diagramas del RMSD, RMSF y Radio de Giro para el proceso de interacción de los ligandos y la TP53.

Todavía cabe señalar que al análisis de radio de giro también se realizó para las simulaciones moleculares de la TP53 con los cinco metabolitos(ver figura 3.21(c)). Acá se aprecia que con el BCT existe una ligera descompactación desde los 60ns. Mientras que tanto con el KPF como con la LCA y la NRG mantiene una estabilidad



**Figura 3.22:** Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la AKT1.

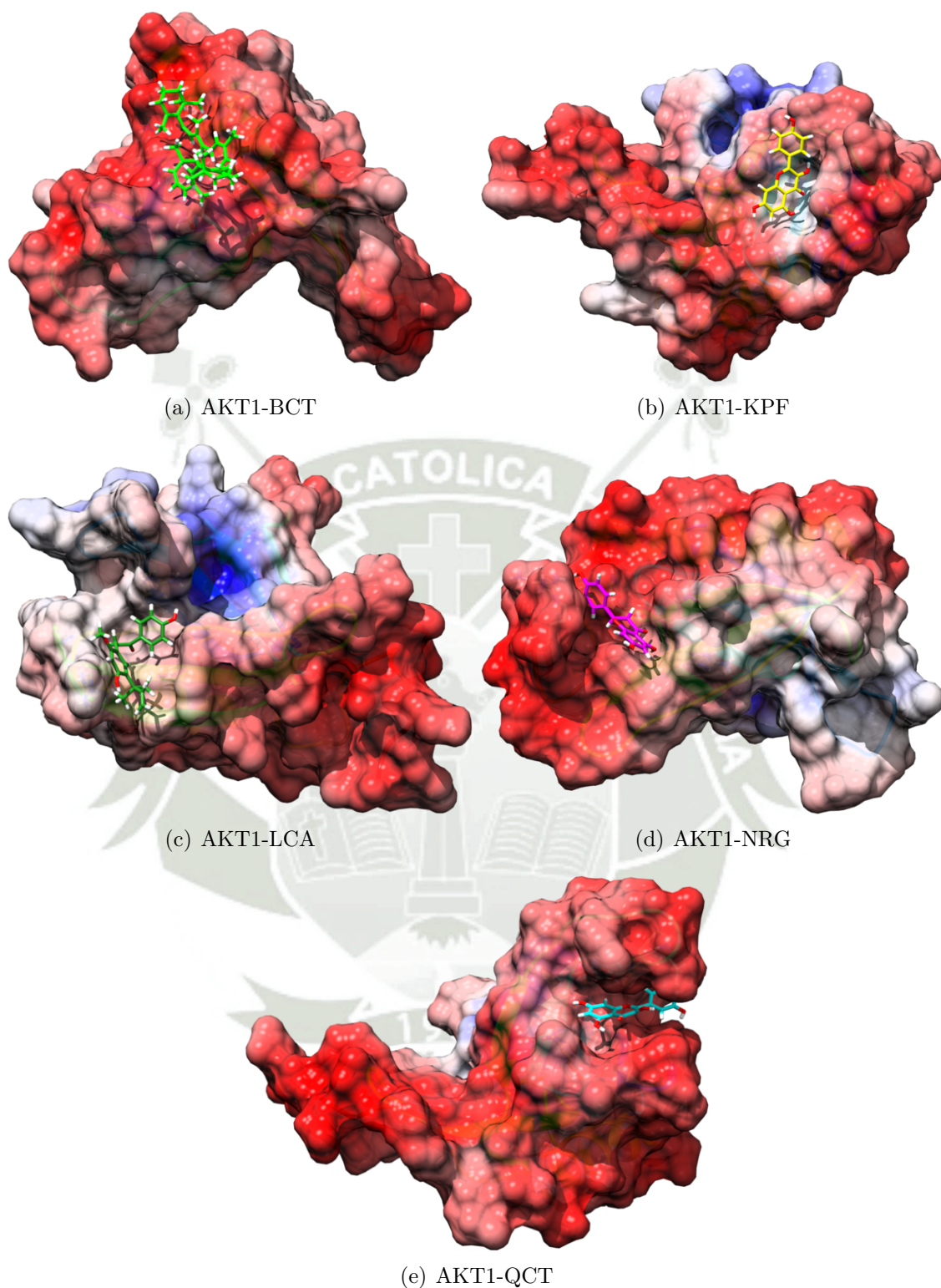
a lo largo de la dinámica, sin embargo, es con la QCT que en los últimos 10ns que la proteína se compacta y descompacta brevemente.

En el presente estudio, también realizamos un análisis de las cargas a nivel superficial tanto del sistema proteicos como de los sistemas proteína – ligando, aunque en la mecánica molecular no se consideran electrones, se puede utilizar la aproximación de APBS, las superficies las discutiremos a continuación. Así entonces, para el caso de la proteína AKT1 la superficie de potencial electrostático, se muestra en la figura 3.22.

Donde podemos apreciar que la cara posterior (ver figura 3.22(a)) presenta carga negativa superficial, mientras que la cara anterior (ver figura 3.22(b)) presenta una región positiva marca y otra región positiva tenue.

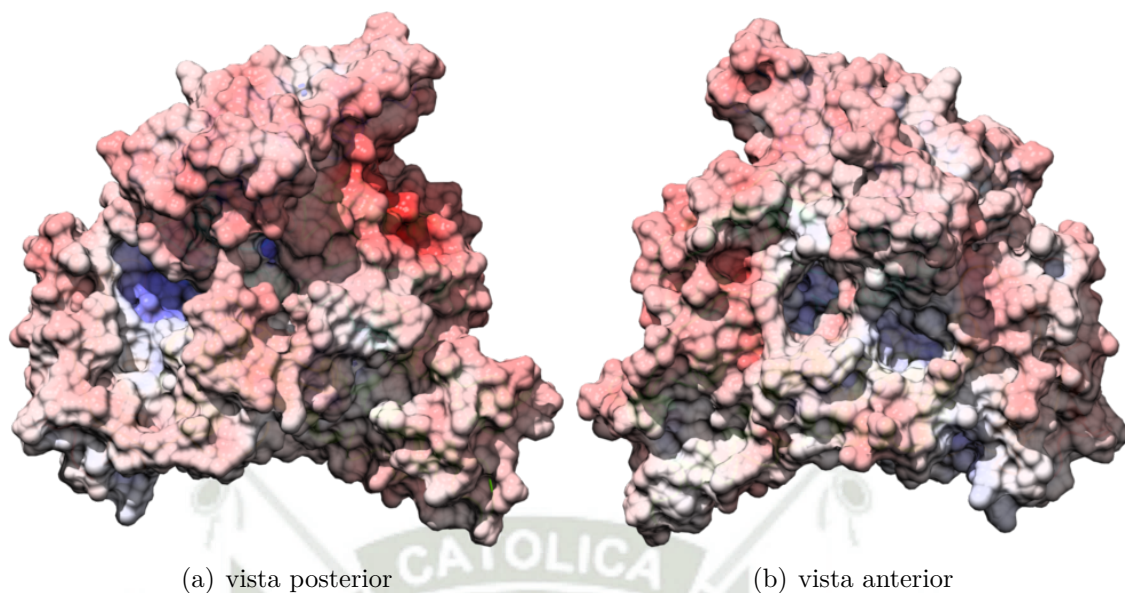
A los sistemas interactuantes finales de las biomoléculas con la AKT1, en la última configuración estructural obtenida desde la simulación de dinámica molecular en la trayectoria de 100ns, es decir que transformamos el archivo final *gro* a formato *pdb* y se le procedió a calcular la superficie del potencial electrostático, como se muestra en la figura 3.23.

Además, para el caso de los metabolitos como el BCT, la NRG y la QCT (ver figura 3.23(a), 3.23(d) y 3.23(e)) podemos observar que se unen en la región superfi-



**Figura 3.23:** Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la AKT1 con los metabolitos secundarios.

cial negativa que consta de cavidades, mientras que para el caso de KPF y LCA (ver figura 3.23(b) y 3.23(c)) los metabolitos secundarios prefirieron la zona superficial de la densidad electrónica con una carga negativa tenue, muy cercana a un bolsillo de



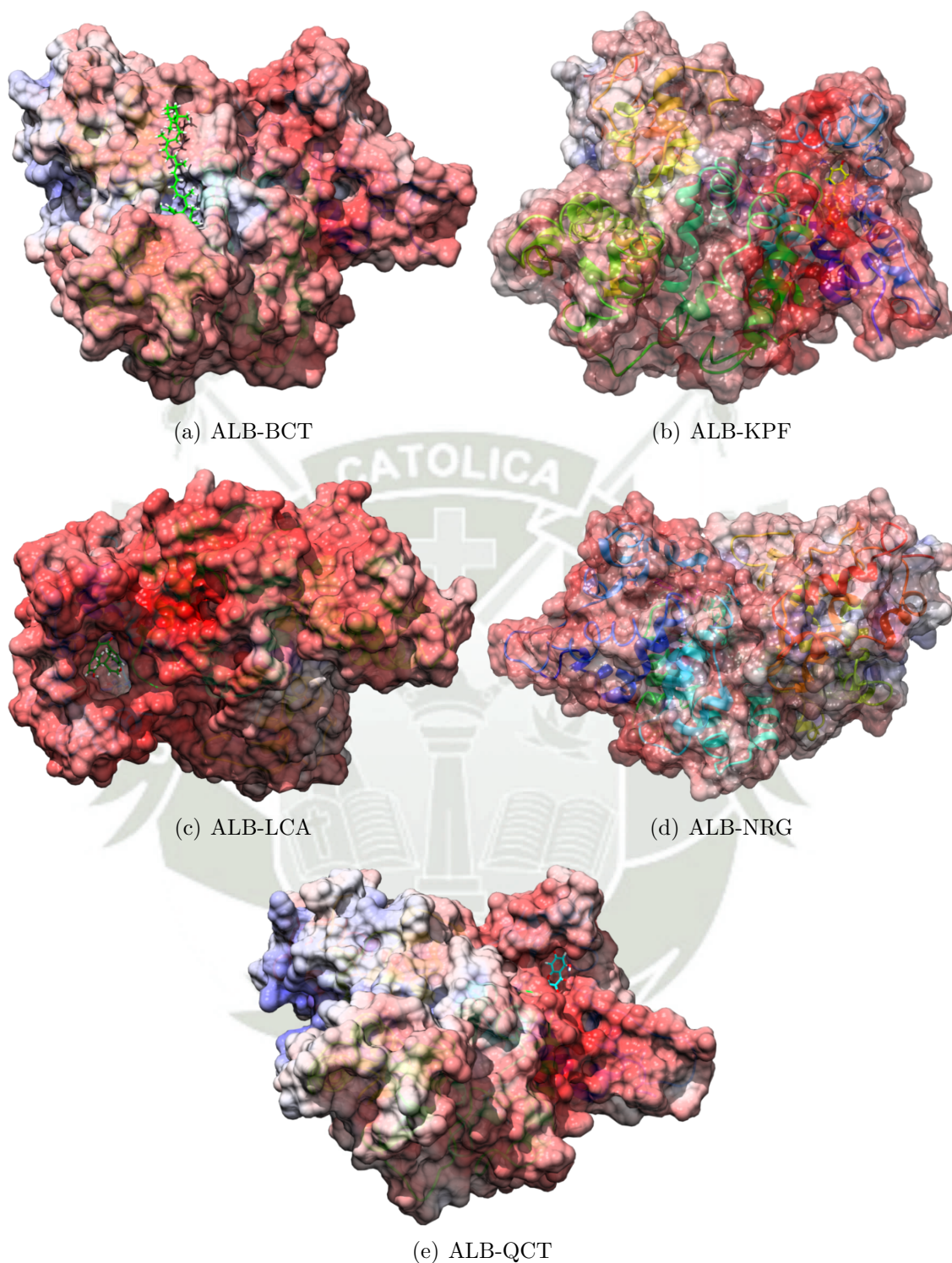
**Figura 3.24:** Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la ALB.

la proteína en la región superficial con una carga positiva. esto se aprecia claramente en la figura 3.23(c).

Así mismo, en relación con la proteína ALB, se procedió a la generación de su superficie de potencial electrostático, esta se presenta en la figura 3.24. Observamos que en la cara posterior (ver figura 3.24(a)) exhibe una carga negativa un tanto más pronunciado con una pequeña región, mientras que también se puede apreciar una pequeña cavidad con carga positiva, por otro lado, la superficie anterior (ver figura 3.24(b)) muestra amplias regiones de la superficie negativa y dos pequeñas cavidades con suave región positiva.

A partir de la última configuración estructural generada por la simulación de dinámica molecular con una trayectoria de 100ns, se calculó la superficie de potencial electrostático para los sistemas finales que contienen a los metabolitos secundarios que interactúan con la ALB, como se muestra en la figura 3.25.

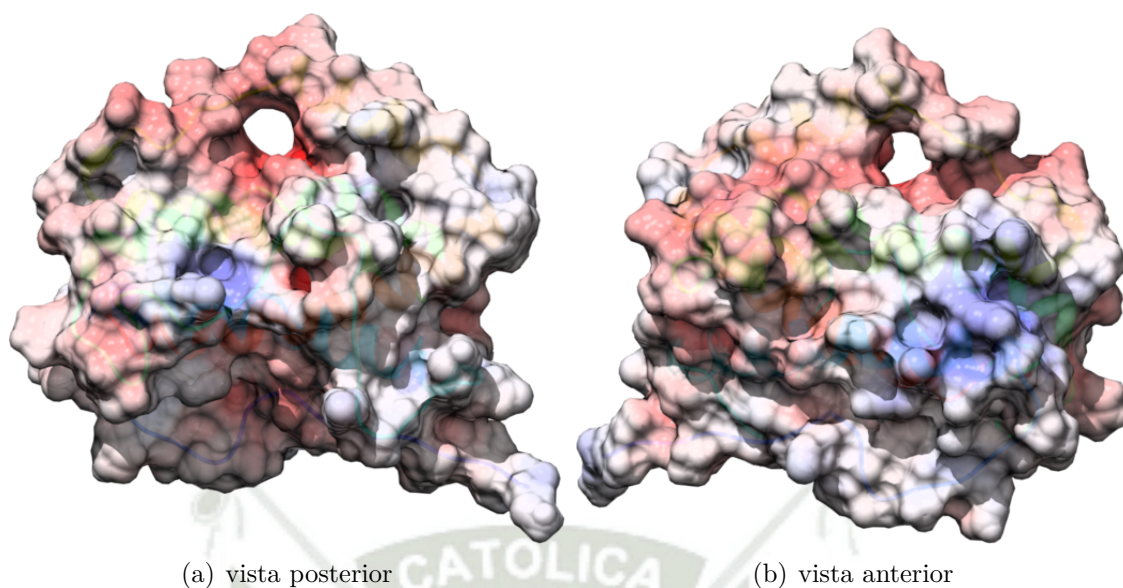
Para el caso de la biomolécula como el BCT (ver figura 3.25(a)) la interacción convergente se realiza en una región compartida entre una zona con carga negativa tenue y una región de cavidad de carga positiva; mientras que para los metabolitos secundarios como el KPF y la NRG (ver figura 3.25(b) y 3.25(d)) estos se hallan al interior de la proteína, cuyo ingreso se realizó por efecto de adaptación de una



**Figura 3.25:** Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la ALB con los metabolitos secundarios.

de las cavidades o tuneles de la proteína, la región interior se puede apreciar que es ligeramente negativa.

Además, el caso de la LCA y la QCT (ver figura 3.25(c) y 3.25(e)) estas prefieren la



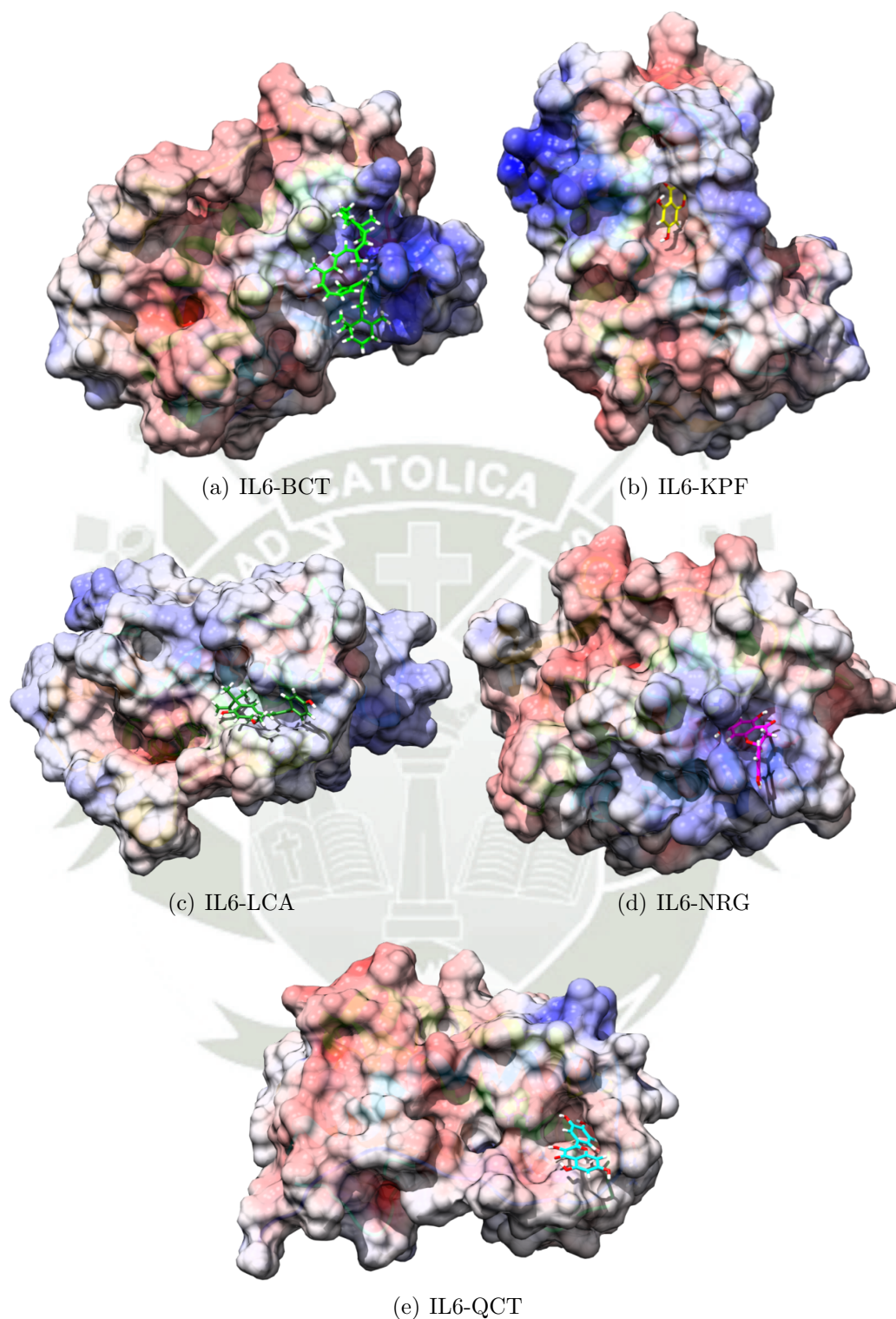
**Figura 3.26:** Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la IL6.

zona superficial de la densidad electrónica que posee una carga negativa, ubicándose en una cavidad superficial de la proteína, también denominados bolsillos.

Por lo tanto, para el caso de la proteína IL6, se presenta el resultado de la generación de la superficie de potencial electrostático en la figura 3.26. Como se puede apreciar en la cara posterior (ver figura 3.26(a)) que esta presenta una cavidad que tiene una carga negativa, aunque también tiene una pequeña con una carga positiva sutil; mientras que respecto a la cara anterior (ver figura 3.26(b)) se muestra una región en su superficie que es más amplia con una carga positiva y zonas con una carga negativa mas tenue.

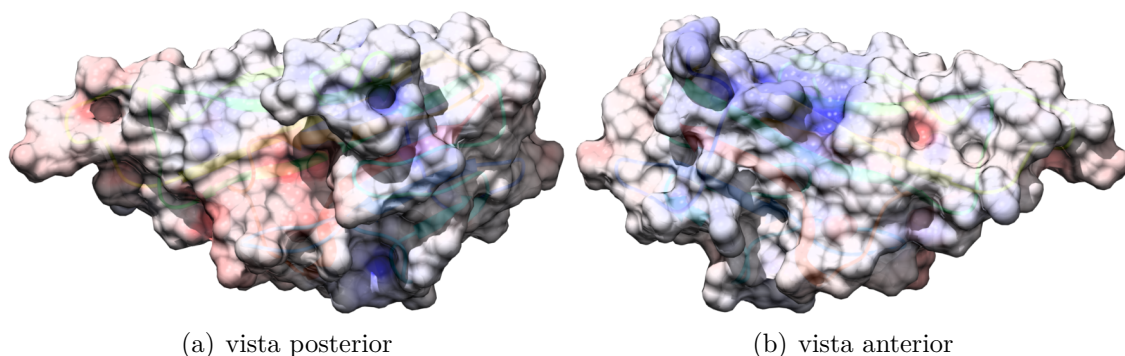
Todavía cabe señalar que para la última configuración estructural originada a partir de la simulación de dinámica molecular con una trayectoria de 100ns, se procedió con el cálculo de la superficie de potencial electrostático para cada uno de los sistemas finales con las biomoléculas que interactúan con la IL6, como se presenta en la figura 3.27. En el caso del BCT y la NRG (ver figura 3.27(a) y 3.27(d)), denotamos que ambos metabolitos se hallan en cavidades o bolsillos de la proteína mostrando una preferencia por regiones de la superficie que tienen una carga positiva.

Por otra parte, el caso de los metabolitos secundarios como el KPF y la QCT (ver figura 3.27(b) y 3.27(e)), estas biomoléculas se ubicaron en cavidades de la



**Figura 3.27:** Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la IL6 con los metabolitos secundarios.

superficie de la proteína que es una región compartida ya que están adyacentes a regiones con carga positiva y a cavidades que tienen una carga negativa; mientras que para la LCA (ver figura 3.27(c)), esta también se ubica en una zona compartida

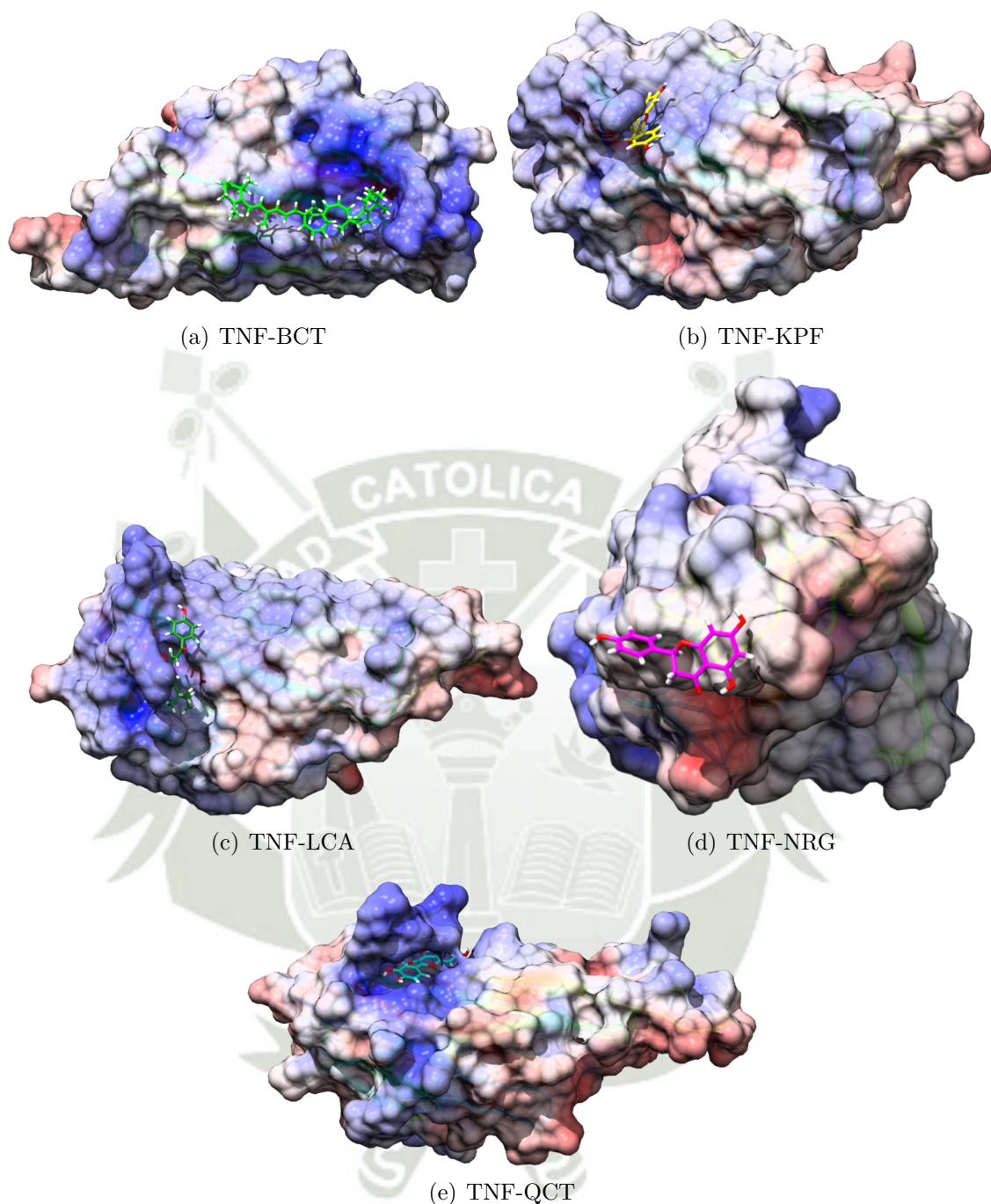


**Figura 3.28:** Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la TNF.

que esta próxima a dos cavidades una que tiene una densidad electrónica con una carga negativa y la otra que tiene carga positiva.

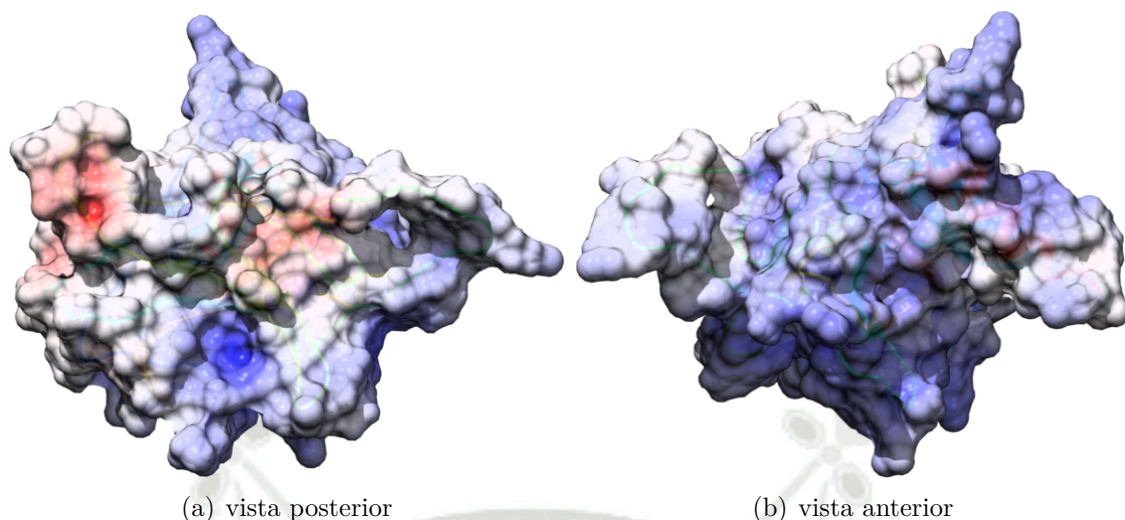
Por consiguiente, respecto a la proteína TNF, se condujo a la de creación de la superficie de potencial electrostático como se observa en la figura 3.28. Se puede apreciar que desde la vista posterior (ver figura 3.28(a)) la proteína tiene diversas cavidades superficiales principalmente que poseen una carga positiva pero también posee algunas zonas en su superficie como bolsillos con una carga negativa que es más sutil; mientras que desde la vista anterior (ver figura 3.28(b)) se muestra una región de la proteína con cavidades que tienen una carga positiva distintiva aunque se muestra una pequeña cavidad con una ligera carga negativa y a su vez en uno de los extremos de la proteína se aprecia una cavidad con carga negativa tenue.

Por otra parte, para la última configuración estructural creada a partir de la simulación de dinámica molecular con una trayectoria de 100ns, se procedió al cálculo de la superficie de potencial electrostático para cada uno de los resultados con los metabolitos secundarios interactuantes con la TNF, tal como se presenta en la figura 3.29. Se puede observar que para el caso del BCT, el KPF, la LCA y la QCT (ver figura 3.29(a),3.29(b),3.29(c) y 3.29(e)), estas biomoléculas se vinculan en la misma región de la superficie de la proteína que posee una gran cavidad además se puede apreciar que dicha zona tiene una carga electrónica alta; es más notable para el caso los metabolitos BCT, LCA y QCT tal y como se denota en las figuras previamente mencionadas.



**Figura 3.29:** Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la TNF con los metabolitos secundarios.

Sin embargo, la excepción es la del caso del KPF que la región donde se ubica que si bien es la misma, esta posee una carga que también es positiva pero más tenue y esta próxima a una cavidad que tiene una carga negativa; en un caso totalmente diferentes es para el metabolito NRG (ver figura 3.29(d)), este se posiciona en una zona superficial diferente que es como un extremo de la proteína pero que esta



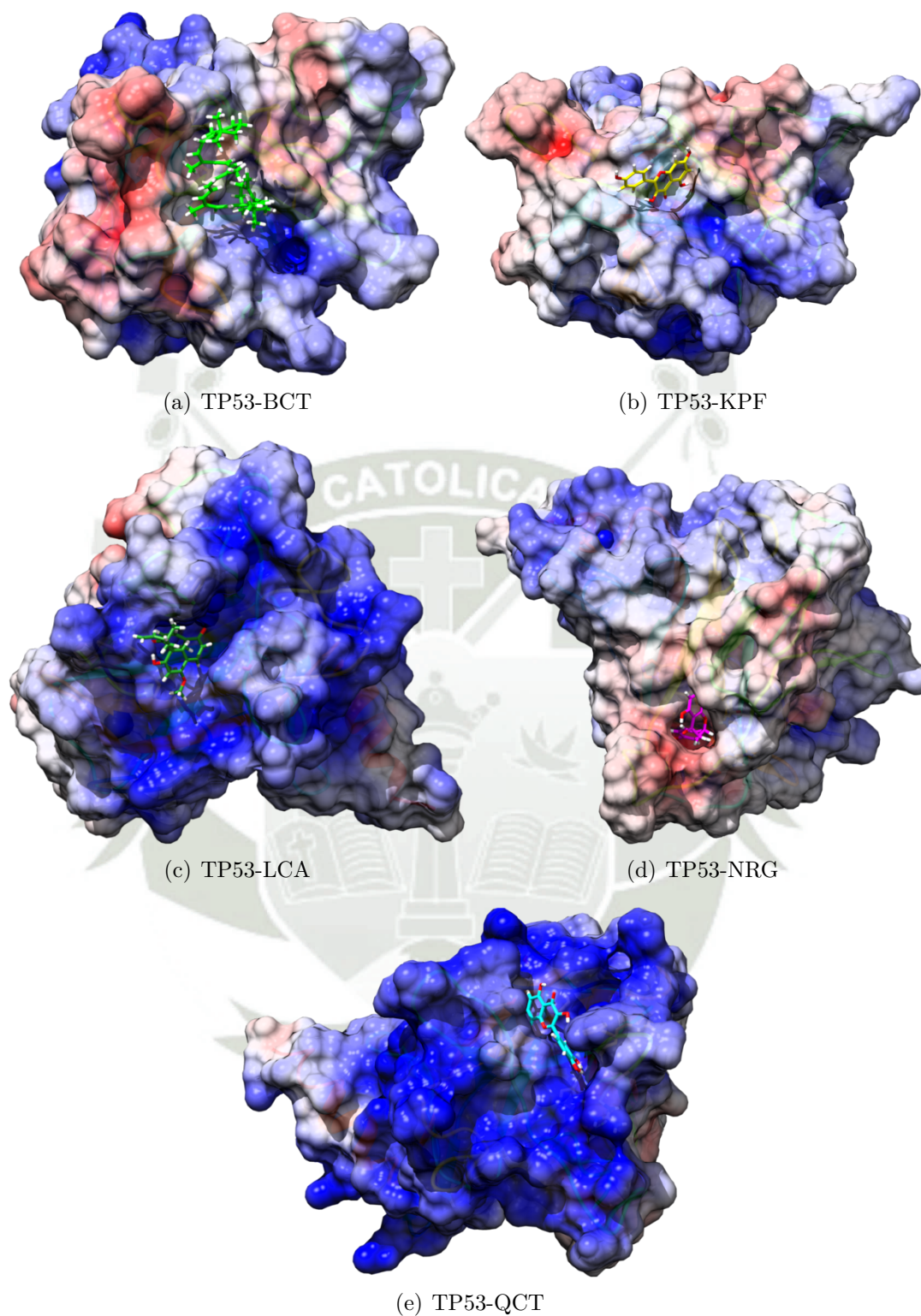
**Figura 3.30:** Análisis del Potencial Electrostático de la estructura terciaria de la TP53.

adyacente a cavidades que tienen por un lado una carga positiva y por otro lado poseen una carga electrónica negativa, debido a esto podríamos decir que es una zona compartida para ambas cargas.

De la misma manera, para el caso la proteína TP53, se puede apreciar cómo es la superficie de potencial electrostático que posee en la figura 3.30. Se observa desde la cara posterior (ver figura 3.30(a)) presenta unas cavidades que una tiene una carga negativa más intensa mientras que otra es un poco más leve, pero también destaca que tiene un bolsillo en su superficie con una carga positiva y el resto de las regiones en su mayoría también están cargadas positivamente. Además, al observar la cara anterior (ver figura 3.30(b)) se muestra que prácticamente toda la superficie proteica tiene una carga electrónica positiva con pequeñas zonas en las que la carga es más leve.

Por otro lado, para la última configuración estructural generada gracias a la simulación de dinámica molecular con una trayectoria de 100 ns, se calculó la superficie de potencial electrostático para todos los sistemas finales que contienen las biomoléculas que interactuaron con la TP53, tal y como se muestra en la figura 3.31.

En el caso del BCT y el KPF (ver figura 3.31(a) y 3.31(b)), estas convergen en la región superficial que es compartida con cavidades que tienen una carga negativa y con otra región con bolsillos de carga positiva, mientras que para el caso de la



**Figura 3.31:** Análisis del potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la TP53 con los metabolitos secundarios.

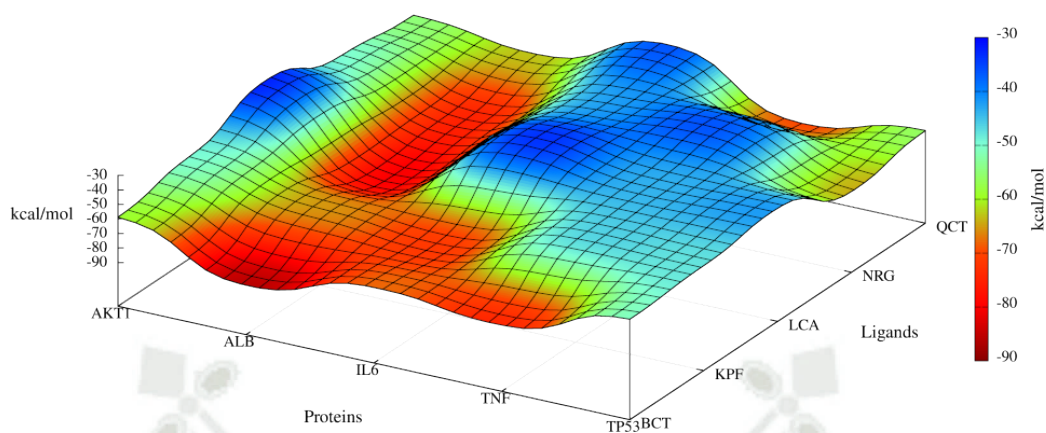
LCA y la QCT (ver figura 3.31(c) y 3.31(e)), estos los metabolitos secundarios se posicionaron en una zona superficial con muchas cavidades que tienen una densidad electrónica de carga positiva.

**Tabla 3.3:** Energías Libre de Interacción,  $\Delta G_{int}$  (kcal/mol)

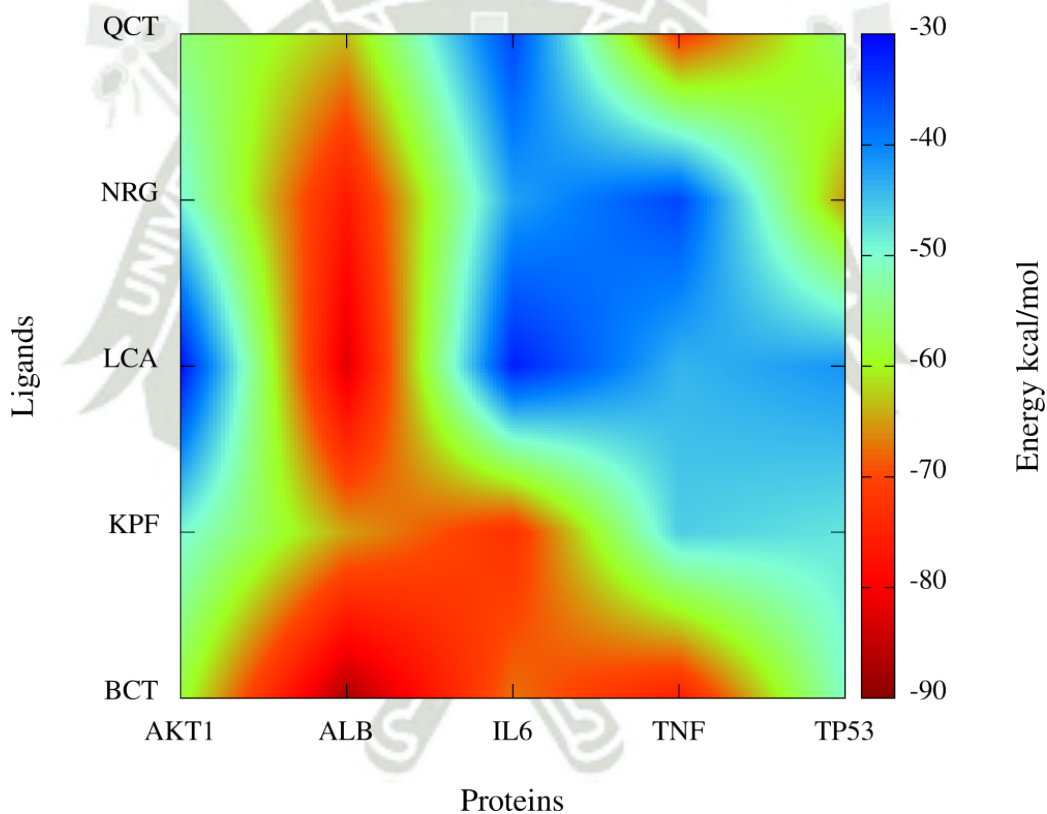
Proteínas	Ligandos				
	BCT	KPF	LCA	NRG	QCT
AKT1	-58.531	-49.611	-30.821	-49.455	-55.008
ALB	-87.367	-64.959	-82.830	-76.616	-63.512
IL6	-67.538	-72.969	-32.223	-42.665	-35.218
TNF	-75.642	-46.117	-44.166	-35.378	-71.681
TP53	-50.536	-48.012	-41.646	-65.487	-55.799

Asimismo, la NRG mostro una ubicación en un bolsillo en la superficie, el cual presenta una carga negativa y está cerca de otras cavidades que comparten cargas positivas y negativas (ver figura 3.31(d)).

En la tabla 3.3 presentamos las energías de interacción entre las cinco proteínas y los cinco ligandos de nuestro presente estudio, si tomamos en consideración los metabolitos secundarios, podemos decir que para el caso del BCT la mejor interacción se logra con la proteína  $ALB > TNF > IL6 > AKT1 > TP53$ , para el KPF la interacción más preferible se consigue con la proteína  $IL6 > ALB > AKT1 > TP53 > TNF$ , en el caso de la LCA la mejor interacción la alcanza con la proteína  $ALB > TNF > TP53 > IL6 > AKT1$ , en cuanto a la NRG la mejor interacción la logra con la proteína  $ALB > TP53 > AKT1 > IL6 > TNF$ , y respecto a la QCT la interacción más conveniente la consigue con la proteína  $TNF > ALB > TP53 > AKT1 > IL6$ . Por otro lado, si se toma en consideración a las proteínas, podemos decir que en el caso de la AKT1 su mejor interacción fue con el metabolito  $BCT > QCT > KPF > NRG > LCA$ , en el caso de la ALB su interacción más preferible la consigue con el metabolito  $BCT > LCA > NRG > KPF > QCT$ , respecto a la IL6 su interacción más conveniente la alcanza con el metabolito  $KPF > BCT > NRG > QCT > LCA$ , en cuanto a la TNF la mejor interacción la logra con el metabolito  $BCT > QCT > KPF > LCA > NRG$ , y por último para el caso de la TP53 su interacción más preferible la consigue con el metabolito  $NRG > QCT > BCT > KPF > LCA$ .



(a) Mapa de Calor Tridimensional



(b) Mapa de Calor Bidimensional

**Figura 3.32:** Mapa de calor de las Energías Libres de Interacción

Para un mejor entendimiento de los resultados de las energías libres de interacción  $\Delta G_{int}$ , realizamos un mapa de calor (ver figura 3.32), tanto tridimensional (ver figura 3.32(a)) como bidimensional (ver figura 3.32(b)). Desde el mapa tridimensional nos damos cuenta de que para el caso de la ALB se presentan las mejores interacciones, en relación al BCT, LCA y NRG, y se nota desfavorable para el caso

del KPF y la QCT.

Así mismo, para la IL6 observamos que solamente en los caso de BCT y KPF las interacciones son favorables, por otro lado, para el caso de la TNF solo el BCT y QCT son las interacciones favorecidas, mientras que para la TP53 la única interacción favorable que posee es con la NRG; esto lo podemos corroborar desde el diagrama bidimensional, donde se aprecia con claridad cómo es la ALB quien presenta las mejores energías de interacción, en comparación al resto de sistemas proteicos, para los metabolitos secundarios como el BCT, la LCA y la NRG, siendo la del  $\beta$  Caroteno la mejor entre todas las interacciones de las cinco proteínas con las cinco biomoléculas; para el caso de la IL6 también se aprecia cómo es que su interacción con mejor energía es con el BCT y especialmente con el KPF que es el metabolito con el que su interacción fue la mejor en comparación al resto de sistemas proteicos. Por otra parte, que la TNF solo tiene como favorables a su interacción con el BCT y la QCT, y en el caso esta última, es la mejor energía libre interacción entre todos los resultados; mientras que la TP53 es la segunda proteína con mejor energía libre de interacción para el metabolito NRG solo superada por la proteína ALB. Podemos notar que el BCT y el KPF son las biomoléculas que generan una energía libre de interacción más preferible entre las cinco proteínas.

## Conclusiones

1. Se obtuvo las cinco estructuras de los sistemas proteicos de la base de datos de RCSB PDB, de igual forma para las estructuras de los cinco metabolitos secundarios gracias a la base de datos de PubChem.
2. A partir de las estructuras tridimensionales de las proteínas, se logró completar con éxito los residuos faltantes en aquellas que lo requerían haciendo uso del programa Modeller.
3. La estabilización de las cinco moléculas se consiguió mediante las aproximaciones semiempíricas y la Teoría Funcional de la Densidad con el software Gaussian 16 y su visualizador, GaussView.
4. Se logró minimizar las fuerzas para cada uno de los sistemas proteicos y obtener su correspondiente estructura equilibrada.
5. El equilibrio de los cinco sistemas se consiguió con 10ns en un ensamble NVT y 500ns en un ensamble NPT, generando de forma correcta las estructuras equilibradas de cada sistema.
6. Gracias al servidor de LigParGen se generó los parámetros correspondientes a la forma funcional de campo de fuerza OPLS-AA para los cinco metabolitos secundarios.
7. El acoplamiento molecular fue exitoso para cada proteína con los cinco diferentes metabolitos secundarios seleccionando los resultados más estables.

8. Por consiguiente, la dinámica molecular de cada complejo alcanzó su estabilidad después de los 100ns en el ensamble NPT manteniendo las interacciones con las cinco biomoléculas.
9. Finalmente, se analizó las características de los potenciales electrostáticos y a que zonas con determinada carga tienen una afinidad los ligandos. Por último, para las energías de interacción se realizó el mapa de calor con el que se encontró que la proteína ALB mantiene los mejores resultados al interactuar con los metabolitos BCT, LCA y NRG.



## Recomendaciones

Se recomienda realizar la dinámica molecular con el mismo tiempo de trayectoria con los modelos tridimensionales en dímeros, trímeros y/o tetrámeros dependiendo de la proteína para corroborar que mantienen una estabilidad similar a su forma monomérica. Así mismo, se puede complementar los resultados del presente trabajo con otro tipo de análisis como el análisis de los bolsillos y túneles y cálculos de energía libre de interacción con el método de MM-GBSA. Por último, se puede contrastar los resultados con ensayos in vitro e in vivo en el laboratorio para tener datos experimentales que contradigan o apoyen los resultados de este estudio.

## Referencias

- [1] Rappaport, J. *Journal of Economic Geography* **2009**, *9*, 779–804.
- [2] Frisch, M. B. *Social Indicators Research Series* **2000**, 207–241.
- [3] Connell, J.; Brazier, J.; O’Cathain, A.; Lloyd-Jones, M.; Paisley, S. *Health and Quality of Life Outcomes* **2012**, *10*, 138.
- [4] Belloc, N. B.; Breslow, L. *Preventive Medicine* **1972**, *1*, 409–421.
- [5] Sarfati, D.; Koczwara, B.; Jackson, C. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2016**, *66*, 337–350.
- [6] Gijssen, R.; Hoeymans, N.; Schellevis, F. G.; Ruwaard, D.; Satariano, W. A.; van den Bos, G. A. *Journal of Clinical Epidemiology* **2001**, *54*, 661–674.
- [7] HOFFMANN, S.; BATZ, M. B.; MORRIS, J. G. *Journal of Food Protection* **2012**, *75*, 1292–1302.
- [8] van Doorslaer, E. *Canadian Medical Association Journal* **2006**, *174*, 177–183.
- [9] Guralnik, J. M. *Annals of Epidemiology* **1996**, *6*, 376–380.
- [10] Glyn-Jones, S.; Palmer, A. J. R.; Agricola, R.; Price, A. J.; Vincent, T. L.; Weinans, H.; Carr, A. J. *The Lancet* **2015**, *386*, 376–387.
- [11] Deng, P.; Liang, H.; Xie, K.; Han, J.; Huang, F.; Liu, H.; Zhu, H.; Huang, Z.; Wu, Q.; Tao, J.; Li, L.; Chen, Z. *Allergologia et Immunopathologia* **2021**, *49*, 16–30.

- [12] Georgiev, T.; Angelov, A. K. *Rheumatology International* **2019**, *39*, 1145–1157.
- [13] Chen, Y.-Y.; Weng, L.-C.; Li, Y.-T.; Huang, H.-L. *BMC Geriatrics* **2022**, *22*.
- [14] Haider, M. Z.; Bhuiyan, R.; Ahmed, S.; Zahid-Al-Quadir, A.; Choudhury, M. R.; Haq, S. A.; Zaman, M. M. *BMC Musculoskeletal Disorders* **2022**, *23*.
- [15] Zheng, X.; Wang, Y.; Jin, X.; Huang, H.; Chen, H.; Wang, Y.; Shang, S. *BMC Geriatrics* **2022**, *22*.
- [16] Oomen, J. M. H.; Peters, Y. A. S.; van den Ende, C. H.; Schers, H. J.; Assendelft, W. J. J.; Vriesekolk, J. E.; Koëter, S. *BMC Health Services Research* **2022**, *22*.
- [17] Velásquez, A. *La Carga de Enfermedad y Lesiones en el Perú*; MINSA, 2008.
- [18] Lawrence, R. C.; Helmick, C. G.; Arnett, F. C.; Deyo, R. A.; Felson, D. T.; Giannini, E. H.; Heyse, S. P.; Hirsch, R.; Hochberg, M. C.; Hunder, G. G.; Liang, M. H.; Pillemer, S. R.; Steen, V. D.; Wolfe, F. *Arthritis Rheum* **1998**, *41*, 778–99.
- [19] Hill, J. *Nursing Older People* **2005**, *17*, 35–35.
- [20] Nuki, G. *Zeitschrift für Rheumatologie* **1999**, *58*, 142–147.
- [21] Garstang, S. V.; Stitik, T. P. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* **2006**, *85*, S2–S11.
- [22] He, Y.; Li, Z.; Alexander, P. G.; Ocasio-Nieves, B. D.; Yocum, L.; Lin, H.; Tuan, R. S. *Biology* **2020**, *9*, 194.
- [23] Oliveria, S. A.; Felson, D. T.; Reed, J. I.; Cirillo, P. A.; Walker, A. M. *Arthritis & Rheumatism* **1995**, *38*, 1134–1141.

- [24] van Saase, J. L.; van Romunde, L. K.; Cats, A.; Vandenbroucke, J. P.; Valkenburg, H. A. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1989**, *48*, 271–280.
- [25] Martin, J. A.; Brown, T. D.; Heiner, A. D.; Buckwalter, J. A. *Clinical Orthopaedics & Related Research* **2004**, *427*, S96–S103.
- [26] Sharma, L.; Pai, Y.-C.; Holtkamp, K.; Rymer, W. Z. *Arthritis & Rheumatism* **1997**, *40*, 1518–1525.
- [27] Felson, D. T. *Clinical Orthopaedics & Related Research* **2004**, *427*, S16–S21.
- [28] Felson, D. T.; Zhang, Y. *Arthritis Rheum* **1998**, *41*, 1343–55.
- [29] Felson, D. T. *Annals of Internal Medicine* **2000**, *133*, 635.
- [30] Loughlin, J. *Current Opinion in Rheumatology* **2001**, *13*, 111–116.
- [31] Kaprio, J.; Kujala, U. M.; Peltonen, L.; Koskenvuo, M. *BMJ* **1996**, *313*, 232–232.
- [32] Lanyon, P. *BMJ* **2000**, *321*, 1179–1183.
- [33] Neame, R. L. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2004**, *63*, 1022–1027.
- [34] Felson, D. T.; Couropmitree, N. N.; Chaisson, C. E.; Hannan, M. T.; Zhang, Y.; McAlindon, T. E.; LaValley, M.; Levy, D.; Myers, R. H. *Arthritis Rheum* **1998**, *41*, 1064–71.
- [35] McKinley, T. O.; Rudert, M. J.; Koos, D. C.; Brown, T. D. *Clinical Orthopaedics & Related Research* **2004**, *423*, 44–51.
- [36] Buckwalter, J. A.; Brown, T. D. *Clin Orthop Relat Res* **2004**, 7–16.
- [37] Felson, D. T.; Zhang, Y.; Hannan, M. T.; Naimark, A.; Weissman, B.; Aliabadi, P.; Levy, D. *Arthritis & Rheumatism* **1997**, *40*, 728–733.

- [38] Manninen, P.; Riihimäki, H.; Heliövaara, M.; Mäkelä, P. *Int J Obes Relat Metab Disord* **1996**, *20*, 595–7.
- [39] Buckwalter, J. A.; Brown, T. D. *Clinical Orthopaedics & Related Research* **2004**, *423*, 7–16.
- [40] Heinegård, D.; Saxne, T. *Nature Reviews Rheumatology* **2010**, *7*, 50–56.
- [41] Houard, X.; Goldring, M. B.; Berenbaum, F. *Current Rheumatology Reports* **2013**, *15*.
- [42] Quinn, T. M.; Häuselmann, H.-J.; Shintani, N.; Hunziker, E. B. *Osteoarthritis Cartilage* **2013**, *21*, 1904–12.
- [43] Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J.; Grodzinsky, A. J. *Instr Course Lect* **2005**, *54*, 465–80.
- [44] Martel-Pelletier, J.; Barr, A. J.; Cicuttini, F. M.; Conaghan, P. G.; Cooper, C.; Goldring, M. B.; Goldring, S. R.; Jones, G.; Teichtahl, A. J.; Pelletier, J.-P. *Nature Reviews Disease Primers* **2016**, *2*.
- [45] Burr, D. B. *Osteoarthritis and Cartilage* **2004**, *12*, 20–30.
- [46] Burr, D. B.; Schaffler, M. B. *Microsc Res Tech* **1997**, *37*, 343–57.
- [47] IMHOF, H.; SULZBACHER, I.; GRAMPP, S.; CZERNY, C.; YOUSSEFZADEH, S.; KAINBERGER, F. *Investigative Radiology* **2000**, *35*, 581–588.
- [48] Lohmander, L. S.; Saxne, T.; Heinegard, D. K. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1994**, *53*, 8–13.
- [49] Xu, L.; Golshirazian, I.; Asbury, B. J.; Li, Y. *Histol Histopathol* **2014**, *29*, 609–18.
- [50] Marcu, K. B.; Otero, M.; Olivotto, E.; Borzi, R. M.; Goldring, M. B. *Curr Drug Targets* **2010**, *11*, 599–613.

- [51] Goldring, M.; Otero, M.; Plumb, D.; Dragomir, C.; Favero, M.; El Hachem, K.; Hashimoto, K.; Roach, H.; Olivotto, E.; Borzì, R.; Marcu, K. *European Cells and Materials* **2011**, *21*, 202–220.
- [52] Sandell, L. J. *Nature Reviews Rheumatology* **2012**, *8*, 77–89.
- [53] Walsh, D. A.; McWilliams, D. F.; Turley, M. J.; Dixon, M. R.; Franses, R. E.; Mapp, P. I.; Wilson, D. *Rheumatology* **2010**, *49*, 1852–1861.
- [54] Suri, S.; Walsh, D. A. *Bone* **2012**, *51*, 204–211.
- [55] Buckland-Wright, C. *Osteoarthritis and Cartilage* **2004**, *12*, 10–19.
- [56] Dieppe, P.; Cushnaghan, J.; Young, P.; Kirwan, J. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1993**, *52*, 557–563.
- [57] Goldring, S. R. *Medical Clinics of North America* **2009**, *93*, 25–35.
- [58] Burr, D. B.; Gallant, M. A. *Nature Reviews Rheumatology* **2012**, *8*, 665–673.
- [59] Goldring, S. R. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **2008**, *34*, 561–571.
- [60] Raynauld, J.-P.; Martel-Pelletier, J.; Berthiaume, M.-J.; Abram, F.; Choquette, D.; Haraoui, B.; Beary, J. F.; Cline, G. A.; Meyer, J. M.; Pelletier, J.-P. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2007**, *67*, 683–688.
- [61] Bastow, E. R.; Byers, S.; Golub, S. B.; Clarkin, C. E.; Pitsillides, A. A.; Fosang, A. J. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2007**, *65*, 395–413.
- [62] Marcelino, J.; et al. *Nature Genetics* **1999**, *23*, 319–322.
- [63] Scanzello, C. R.; Goldring, S. R. *Bone* **2012**, *51*, 249–257.
- [64] Manek, N. J.; Lane, N. E. *Am Fam Physician* **2000**, *61*, 1795–804.
- [65] Sinusas, K. *Am Fam Physician* **2012**, *85*, 49–56.

- [66] Malfait, A.-M.; Schnitzer, T. J. *Nature Reviews Rheumatology* **2013**, *9*, 654–664.
- [67] Hunter, D. J.; Lo, G. H. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **2008**, *34*, 689–712.
- [68] Javaid, M.; Lynch, J.; Tolstykh, I.; Guermazi, A.; Roemer, F.; Aliabadi, P.; McCulloch, C.; Curtis, J.; Felson, D.; Lane, N.; Torner, J.; Nevitt, M. *Osteoarthritis and Cartilage* **2010**, *18*, 323–328.
- [69] Guermazi, A.; Niu, J.; Hayashi, D.; Roemer, F. W.; Englund, M.; Neogi, T.; Aliabadi, P.; McLennan, C. E.; Felson, D. T. *BMJ* **2012**, *345*, e5339–e5339.
- [70] Palmer, A. J. R.; Brown, C. P.; McNally, E. G.; Price, A. J.; Tracey, I.; Jeppard, P.; Carr, A. J.; Glyn-Jones, S. *The Bone & Joint Journal* **2013**, *95-B*, 738–746.
- [71] van Spil, W.; DeGroot, J.; Lems, W.; Oostveen, J.; Lafeber, F. *Osteoarthritis and Cartilage* **2010**, *18*, 605–612.
- [72] Önnerfjord, P.; Khabut, A.; Reinholt, F. P.; Svensson, O.; Heinegård, D. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 18913–18924.
- [73] Felson, D. T.; Zhang, Y.; Anthony, J. M.; Naimark, A.; Anderson, J. J. *Annals of Internal Medicine* **1992**, *116*, 535–539.
- [74] Christensen, R.; Bartels, E. M.; Astrup, A.; Bliddal, H. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2006**, *66*, 433–439.
- [75] Towheed, T.; Maxwell, L.; Judd, M.; Catton, M.; Hochberg, M. C.; Wells, G. A. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2006**, *2010*.
- [76] Rutjes, A. W.; Jüni, P.; da Costa, B. R.; Trelle, S.; Nüesch, E.; Reichenbach, S. *Annals of Internal Medicine* **2012**, *157*, 180.

- [77] Arroll, B.; Goodyear-Smith, F. *BMJ* **2004**, *328*, 869.
- [78] Stephens, M. B.; Beutler, A. I.; O'Connor, F. G. *Am Fam Physician* **2008**, *78*, 971–6.
- [79] Bellamy, N.; Campbell, J.; Welch, V.; Gee, T. L.; Bourne, R.; Wells, G. A. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2006**, *2014*.
- [80] St. Clair, S. F.; Higuera, C.; Krebs, V.; Tadross, N. A.; Dumpe, J.; Barsoum, W. K. *Clinics in Geriatric Medicine* **2006**, *22*, 515–533.
- [81] Kirkley, A.; Birmingham, T. B.; Litchfield, R. B.; Giffin, J. R.; Willits, K. R.; Wong, C. J.; Feagan, B. G.; Donner, A.; Griffin, S. H.; D'Ascanio, L. M.; Pope, J. E.; Fowler, P. J. *New England Journal of Medicine* **2008**, *359*, 1097–1107.
- [82] Hunter, D. J.; Bierma-Zeinstra, S. *The Lancet* **2019**, *393*, 1745–1759.
- [83] Henrotin, Y.; Lambert, C. *Current Rheumatology Reports* **2013**, *15*.
- [84] Ernst, E. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **2008**, *34*, 455–467.
- [85] Manning, B. D.; Cantley, L. C. *Cell* **2007**, *129*, 1261–1274.
- [86] Hanada, M.; Feng, J.; Hemmings, B. A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2004**, *1697*, 3–16.
- [87] Jazirehi, A. R.; Wenn, P. B.; Damavand, M. *Am J Cancer Res* **2012**, *2*, 178–91.
- [88] Jaiikhani, N.; Ravichandran, S.; Hegde, S. R.; Siddiqui, Z.; Mande, S. C.; Rao, K. V. *Genome Research* **2011**, *21*, 2067–2081.
- [89] Fingar, D. C.; Salama, S.; Tsou, C.; Harlow, E.; Blenis, J. *Genes & Development* **2002**, *16*, 1472–1487.
- [90] Xu, N.; Lao, Y.; Zhang, Y.; Gillespie, D. A. *Journal of Oncology* **2012**, *2012*, 1–15.

- [91] Yun, S. J.; Tucker, D. F.; Kim, E. K.; Kim, M. S.; Do, K. H.; Ha, J. M.; Lee, S. Y.; Yun, J.; Kim, C. D.; Birnbaum, M. J.; Bae, S. S. *FEBS Letters* **2009**, *583*, 685–690.
- [92] Kang, B.-J.; Ryu, J.; Lee, C. J.; Hwang, S.-C. *Biomolecules & Therapeutics* **2014**, *22*, 239–245.
- [93] Li, Y.; Tang, M.; Huang, L.-L.; Du, Q.-Q.; Yan, C.; Gu, A.-D.; Yang, J.-L. *World Journal of Traditional Chinese Medicine* **2020**, *6*, 432.
- [94] He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209–215.
- [95] Bhattacharya, A. A.; Grüne, T.; Curry, S. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *303*, 721–732.
- [96] Arroyo, V.; García-Martínez, R.; Salvatella, X. *Journal of Hepatology* **2014**, *61*, 396–407.
- [97] Gioannini, T. L.; Zhang, D.; Teghanemt, A.; Weiss, J. P. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 47818–47825.
- [98] Esparza, G. A.; Teghanemt, A.; Zhang, D.; Gioannini, T. L.; Weiss, J. P. *Innate Immunity* **2011**, *18*, 478–491.
- [99] Rael, L. T.; Bar-Or, R.; Banton, K. L.; Mains, C. W.; Roshon, M.; Tanner, A. H.; Lieser, M. J.; Acuna, D. L.; Bar-Or, D. *Biochemistry and Biophysics Reports* **2018**, *15*, 61–67.
- [100] Ozler, K.; Erel, O.; Gokalp, O.; Avcioglu, G.; Neselioglu, S. *Clinical Laboratory* **2020**, *66*.
- [101] Taga, T.; Kishimoto, T. *Annual Review of Immunology* **1997**, *15*, 797–819.
- [102] Gabay, C. *Arthritis Res Ther* **2006**, *8 Suppl 2*, S3.

- [103] Yang, F.; Zhou, S.; Wang, C.; Huang, Y.; Li, H.; Wang, Y.; Zhu, Z.; Tang, J.; Yan, M. *Scientific Reports* **2017**, *7*.
- [104] Wojdasiewicz, P.; Poniatowski, L. A.; Szukiewicz, D. *Mediators of Inflammation* **2014**, *2014*, 1–19.
- [105] Elliott, M. J.; Maini, R. N.; Feldmann, M.; Long-Fox, A.; Charles, P.; Katsikis, P.; Brennan, F. M.; Walker, J.; Bijl, H.; Ghrayeb, J.; Woody, J. N. *Arthritis & Rheumatism* **1993**, *36*, 1681–1690.
- [106] Targan, S. R.; Hanauer, S. B.; van Deventer, S. J.; Mayer, L.; Present, D. H.; Braakman, T.; DeWoody, K. L.; Schaible, T. F.; Rutgeerts, P. J. *New England Journal of Medicine* **1997**, *337*, 1029–1036.
- [107] Strand, V.; Kimberly, R.; Isaacs, J. D. *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, *6*, 75–92.
- [108] Vassalli, P. *Annual Review of Immunology* **1992**, *10*, 411–452.
- [109] Vandenabeele, P.; Declercq, W.; Beyaert, R.; Fiers, W. *Trends in Cell Biology* **1995**, *5*, 392–399.
- [110] Chen, G.; Goeddel, D. V. *Science* **2002**, *296*, 1634–1635.
- [111] Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. *Cell Death & Differentiation* **2003**, *10*, 45–65.
- [112] Wojdasiewicz, P.; Poniatowski, L. A.; Szukiewicz, D. *Mediators of Inflammation* **2014**, *2014*, 1–19.
- [113] Westacott, C.; Barakat, A.; Wood, L.; Perry, M.; Neison, P.; Bisbinas, I.; Armstrong, L.; Millar, A.; Elson, C. *Osteoarthritis and Cartilage* **2000**, *8*, 213–221.

- [114] Webb, G. R.; Westacott, C. I.; Elson, C. J. *Osteoarthritis and Cartilage* **1998**, *6*, 167–176.
- [115] López-Armada, M.; Caramés, B.; Martín, M.; Cillero-Pastor, B.; Lires-Dean, M.; Fuentes-Boquete, I.; Arenas, J.; Blanco, F. *Osteoarthritis and Cartilage* **2006**, *14*, 1011–1022.
- [116] El Mansouri, F. E.; Chabane, N.; Zayed, N.; Kapoor, M.; Benderdour, M.; Martel-Pelletier, J.; Pelletier, J.; Duval, N.; Fahmi, H. *Arthritis & Rheumatism* **2010**, *63*, 168–179.
- [117] Hardy, M. M.; Seibert, K.; Manning, P. T.; Currie, M. G.; Woerner, B. M.; Edwards, D.; Koki, A.; Tripp, C. S. *Arthritis & Rheumatism* **2002**, *46*, 1789–1803.
- [118] Martel-Pelletier, J.; Pelletier, J.-P.; Fahmi, H. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **2003**, *33*, 155–167.
- [119] Jones, S.; Brockbank, S.; Clements, K.; Le Good, N.; Campbell, D.; Read, S.; Needham, M.; Newham, P. *Osteoarthritis and Cartilage* **2009**, *17*, 124–131.
- [120] Brady, C. A.; Attardi, L. D. *Journal of Cell Science* **2010**, *123*, 2527–2532.
- [121] Shatz, M.; Menendez, D.; Resnick, M. A. *Cancer Research* **2012**, *72*, 3948–3957.
- [122] Menendez, D.; Shatz, M.; Azzam, K.; Garantziotis, S.; Fessler, M. B.; Resnick, M. A. *PLoS Genet* **2011**, *7*, e1001360.
- [123] Kawai, T.; Akira, S. *Semin Immunol* **2007**, *19*, 24–32.
- [124] Sasai, M.; Yamamoto, M. *International Reviews of Immunology* **2013**, *32*, 116–133.

- [125] Brunn, A.; Zornbach, K.; Hans, V. H.; Haupt, W. F.; Deckert, M. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2012**, *71*, 855–867.
- [126] Zhu, X.; Yang, S.; Lin, W.; Wang, L.; Ying, J.; Ding, Y.; Chen, X. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* **2016**, *20*, 529–534.
- [127] Ashraf, S.; Cha, B.-H.; Kim, J.-S.; Ahn, J.; Han, I.; Park, H.; Lee, S.-H. *Osteoarthritis and Cartilage* **2016**, *24*, 196–205.
- [128] Fei, Z.; Gao, Y.; Qiu, M.; Qi, X.; Dai, Y.; Wang, S.; Quan, Z.; Liu, Y.; Ou, J. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **2016**, *58*, 105–113.
- [129] Wang, C.; Ge, Q.; Zhang, Q.; Chen, Z.; Hu, J.; Li, F.; Ye, Z. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2016**, *35*.
- [130] von Lintig, J.; Sies, H. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2013**, *539*, 99–101.
- [131] Bendich, A.; Olson, J. A. *The FASEB Journal* **1989**, *3*, 1927–1932.
- [132] Chew, B. P. *Journal of Dairy Science* **1987**, *70*, 2732–2743.
- [133] Kang, H.; Kim, H. *Journal of Cancer Prevention* **2017**, *22*, 57–61.
- [134] Sies, H.; Stahl, W. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1995**, *62*, 1315S–1321S.
- [135] Bai, S.-K.; Lee, S.-J.; Na, H.-J.; Ha, K.-S.; Han, J.-A.; Lee, H.; Kwon, Y.-G.; Chung, C.-K.; Kim, Y.-M. *Experimental & Molecular Medicine* **2005**, *37*, 323–334.
- [136] M. Calderon-Montano, J.; Burgos-Moron, E.; Perez-Guerrero, C.; Lopez-Lazaro, M. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*, 298–344.
- [137] Kampkötter, A.; Gombitang Nkwonkam, C.; Zurawski, R. F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. *Archives of Toxicology* **2007**, *81*, 849–858.

- [138] Bonina, F.; Puglia, C.; Ventura, D.; Aquino, R.; Tortora, S.; Sacchi, A.; Saija, A.; Tomaino, A.; Pellegrino, M. L.; de Caprariis, P. *J Cosmet Sci* **2002**, *53*, 321–35.
- [139] Sanz, M. J.; Ferrandiz, M. L.; Cejudo, M.; Terencio, M. C.; Gil, B.; Bustos, G.; Ubeda, A.; Gunasegaran, R.; Alcaraz, M. J. *Xenobiotica* **1994**, *24*, 689–699.
- [140] Hibatallah, J.; Carduner, C.; Poelman, M.-C. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1999**, *51*, 1435–1440.
- [141] Wang, L.; Tu, Y.-C.; Lian, T.-W.; Hung, J.-T.; Yen, J.-H.; Wu, M.-J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 9798–9804.
- [142] Park, M. J.; Lee, E. K.; Heo, H.-S.; Kim, M.-S.; Sung, B.; Kim, M. K.; Lee, J.; Kim, N. D.; Anton, S.; Choi, J. S.; Yu, B. P.; Chung, H. Y. *Journal of Medicinal Food* **2009**, *12*, 351–358.
- [143] Kim, J. M.; Lee, E. K.; Kim, D. H.; Yu, B. P.; Chung, H. Y. *AGE* **2010**, *32*, 197–208.
- [144] García-Mediavilla, V.; Crespo, I.; Collado, P. S.; Esteller, A.; Sánchez-Campos, S.; Tuñón, M. J.; González-Gallego, J. *European Journal of Pharmacology* **2007**, *557*, 221–229.
- [145] Jung, C. H.; Kim, J. H.; Hong, M. H.; Seog, H. M.; Oh, S. H.; Lee, P. J.; Kim, G. J.; Kim, H. M.; Um, J. Y.; Ko, S.-G. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *110*, 490–497.
- [146] Kowalski, J.; Samojedny, A.; Paul, M.; Pietsz, G.; Wilczok, T. *Pharmacol Rep* **2005**, *57*, 390–4.
- [147] Zhuang, Z.; Ye, G.; Huang, B. *Medical Science Monitor* **2017**, *23*, 3925–3931.

- [148] YOON, H.-Y.; LEE, E.-G.; LEE, H.; CHO, I. J.; CHOI, Y. J.; SUNG, M.-S.; YOO, H.-G.; YOO, W.-H. *International Journal of Molecular Medicine* **2013**, *32*, 971–977.
- [149] Furusawa, J.-i.; Funakoshi-Tago, M.; Mashino, T.; Tago, K.; Inoue, H.; Sonoda, Y.; Kasahara, T. *International Immunopharmacology* **2009**, *9*, 499–507.
- [150] Furusawa, J.-i.; Funakoshi-Tago, M.; Tago, K.; Mashino, T.; Inoue, H.; Sonoda, Y.; Kasahara, T. *Cellular Signalling* **2009**, *21*, 778–785.
- [151] Jia, T.; Qiao, J.; Guan, D.; Chen, T. *Inflammation* **2017**, *40*, 1894–1902.
- [152] Sun, C.-C.; Li, S.-J.; Yang, C.-L.; Xue, R.-L.; Xi, Y.-Y.; Wang, L.; Zhao, Q.-L.; Li, D.-J. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*, 17784–17795.
- [153] Buelna-Chontal, M.; Zazueta, C. *Cellular Signalling* **2013**, *25*, 2548–2557.
- [154] Lee, C.-H.; Jeong, T.-S.; Choi, Y.-K.; Hyun, B.-H.; Oh, G.-T.; Kim, E.-H.; Kim, J.-R.; Han, J.-I.; Bok, S.-H. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *284*, 681–688.
- [155] Manchope, M. F.; Calixto-Campos, C.; Coelho-Silva, L.; Zarpelon, A. C.; Pinho-Ribeiro, F. A.; Georgetti, S. R.; Baracat, M. M.; Casagrande, R.; Verri, W. A. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0153015.
- [156] Martinez, R. M.; Pinho-Ribeiro, F. A.; Steffen, V. S.; Silva, T. C. C.; Caviglione, C. V.; Bottura, C.; Fonseca, M. J. V.; Vicentini, F. T. M. C.; Vignoli, J. A.; Baracat, M. M.; Georgetti, S. R.; Verri, W. A.; Casagrande, R. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0146296.
- [157] Bussmann, A. J. C.; Borghi, S. M.; Zaninelli, T. H.; dos Santos, T. S.; Guazelli, C. F. S.; Fattori, V.; Domiciano, T. P.; Pinho-Ribeiro, F. A.; Ruiz-Miyazawa, K. W.; Casella, A. M. B.; Vignoli, J. A.; Camilios-Neto, D.; Casagrande, R.; Verri, W. A. *Inflammopharmacology* **2019**, *27*, 1229–1242.

- [158] Manchope, M. F.; Artero, N. A.; Fattori, V.; Mizokami, S. S.; Pitol, D. L.; Issa, J. P. M.; Fukada, S. Y.; Cunha, T. M.; Alves-Filho, J. C.; Cunha, F. Q.; Casagrande, R.; Verri, W. A. *Inflammation Research* **2018**, *67*, 997–1012.
- [159] Pinho-Ribeiro, F. A.; Zarpelon, A. C.; Fattori, V.; Manchope, M. F.; Mizokami, S. S.; Casagrande, R.; Verri, W. A. *Neuropharmacology* **2016**, *105*, 508–519.
- [160] Harwood, M.; Danielewska-Nikiel, B.; Borzelleca, J.; Flamm, G.; Williams, G.; Lines, T. *Food and Chemical Toxicology* **2007**, *45*, 2179–2205.
- [161] Mamani-Matsuda, M.; Kauss, T.; Al-Kharrat, A.; Rambert, J.; Fawaz, F.; Thiolat, D.; Moynet, D.; Coves, S.; Malvy, D.; Mossalayi, M. D. *Biochemical Pharmacology* **2006**, *72*, 1304–1310.
- [162] Zhang, J.; Yin, J.; Zhao, D.; Wang, C.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Li, T. *Journal of International Medical Research* **2019**, *48*, 030006051987346.
- [163] K. I. Ramachandran, K. N. a., Deepa Gopakumar *Molecular Mechanics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; p 205–227.
- [164] Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 11225–11236.
- [165] Berman, H. M. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235–242.
- [166] Burley, S. K.; et al. *Nucleic Acids Research* **2020**, *49*, D437–D451.
- [167] Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B. A.; Thiessen, P. A.; Yu, B.; Zaslavsky, L.; Zhang, J.; Bolton, E. E. *Nucleic Acids Research* **2020**, *49*, D1388–D1395.
- [168] Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605–1612.

- [169] Webb, B.; Sali, A. *Current Protocols in Bioinformatics* **2016**, *54*.
- [170] Martí-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F.; Šali, A. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2000**, *29*, 291–325.
- [171] Šali, A.; Blundell, T. L. *Journal of Molecular Biology* **1993**, *234*, 779–815.
- [172] Fiser, A.; Do, R. K. G.; Šali, A. *Protein Science* **2000**, *9*, 1753–1773.
- [173] Frisch, M. J.; et al.; *Gaussian 16 Revision C.01*; 2016; Gaussian Inc. Wallingford CT.
- [174] Dennington, R.; Keith, T. A.; Millam, J. M.; *GaussView Version 6*; 2019; Semichem Inc. Shawnee Mission KS.
- [175] Bauer, P.; Hess, B.; Lindahl, E.; *GROMACS 2022.3 Manual*; 2022. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7037337>.
- [176] Laskowski, R. A.; Jabłońska, J.; Pravda, L.; Vařeková, R. S.; Thornton, J. M. *Protein Science* **2017**, *27*, 129–134.
- [177] Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 6665–6670.
- [178] Dodda, L. S.; Vilseck, J. Z.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*, 3864–3870.
- [179] Dodda, L. S.; Cabeza de Vaca, I.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *Nucleic Acids Research* **2017**, *45*, W331–W336.
- [180] Eberhardt, J.; Santos-Martins, D.; Tillack, A. F.; Forli, S. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2021**, *61*, 3891–3898.
- [181] Trott, O.; Olson, A. J. *J Comput Chem* **2010**, *31*, 455–61.

- [182] Miller, B. R.; McGee, T. D.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2012**, *8*, 3314–3321.
- [183] Jurrus, E.; et al. *Protein Science* **2017**, *27*, 112–128.
- [184] Bank, R. E.; Holst, M. *SIAM Review* **2003**, *45*, 291–323.
- [185] Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 10037–10041.
- [186] Holst, M. *Advances in Computational Mathematics* **2001**, *15*, 139–191.
- [187] Mark, P.; Nilsson, L. *The Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 9954–9960.
- [188] Milburn, C.; Deak, M.; Kelly, S.; Price, N.; Alessi, D.; van Aalten, D. **2004**.
- [189] MILBURN, C. C.; DEAK, M.; KELLY, S. M.; PRICE, N. C.; ALESSI, D. R.; van AALTEN, D. M. F. *Biochemical Journal* **2003**, *375*, 531–538.
- [190] Wardell, M.; Wang, Z.; Ho, J.; Robert, J.; Ruker, F.; Ruble, J.; Carter, D. **2003**.
- [191] Wardell, M.; Wang, Z.; Ho, J. X.; Robert, J.; Ruker, F.; Ruble, J.; Carter, D. C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *291*, 813–819.
- [192] Somers, W.; Stahl, M.; Seehra, J. **1998**.
- [193] Somers, W. *The EMBO Journal* **1997**, *16*, 989–997.
- [194] Sheriff, S. **2020**.
- [195] Xiao, H.-Y.; et al. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 15050–15071.
- [196] Chen, Y.; Chen, L. **2013**.
- [197] Chen, Y.; Zhang, X.; Dantas Machado, A. C.; Ding, Y.; Chen, Z.; Qin, P. Z.; Rohs, R.; Chen, L. *Nucleic Acids Research* **2013**, *41*, 8368–8376.

- [198] PubChem; *PubChem Compound Summary for CID 5280489, Beta-Carotene.*;  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280489>; 2023.
- [199] PubChem; *PubChem Compound Summary for CID 5280863, Kaempferol.*;  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280863>; 2023.
- [200] PubChem; *PubChem Compound Summary for CID 5318998, Licochalcone a.*;  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5318998>; 2023.
- [201] PubChem; *PubChem Compound Summary for CID 932, 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one.*; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/932>; 2023.
- [202] PubChem; *PubChem Compound Summary for CID 5280343, Quercetin.*;  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343>; 2023.

# Apéndice A

## Secuencias

Todas las secuencias fueron extraídas del servidor de UniProt, y se presentan los archivos tipo fasta que utilizamos en el presente trabajo.

**Tabla A.1:** Secuencia Fasta del P31749

P31749  
MSDVAIVKEGWLHKRGEYIKTWRPRYFLLKNDGTFIGYKERPQDVDQREAPLNNFSVAQCQLMKTERPR  
PNTFIIIRCLQWTTVIERTFHVETPEEREWTTAIQTVADGLKKQEEEMDFRSGSPSDNSGAEEMEVS  
AKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVLVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEVAHTLTENRVLQNSRH  
PFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDYLHSEKNVVYRD  
LENLMLDKDGHIKITDFGLCKEIKDGATMKTFCGTPEYLAPVLEDNDYGRAVDWWGLGVVYEMMCG  
RLPFYNQDHEKLFELILMEEIRFPRTLGPAAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGIVWQ  
HVYEKLSPPFKPQVTSSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMCEVDSERRPHFPQFSYSASGTA

**Tabla A.2:** Secuencia Fasta del P02768

P02768  
MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNE  
VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP  
LPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLD  
ELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLE  
CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAE  
AKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRRAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFPKLVVEEPQNLIKQ  
NCELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ  
LCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA  
LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL

**Tabla A.3:** Secuencia Fasta del P05231

P05231  
MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRK  
ETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEE  
QARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLR  
ALRQM

**Tabla A.4:** Secuencia Fasta del P01375

P01375  
MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSL  
ISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQV  
LFGKGGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGD  
LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

**Tabla A.5:** Secuencia Fasta del P04637

P04637  
MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEA  
APPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLA  
KTCPVQLWVDSTPPPGRVVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLD  
DRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDDCTTIHNYMCMSSCMGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVVRVCA  
CPGRDRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELN  
EAL ELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDS

## Apéndice B

# Análisis de Estructuras Secundarias



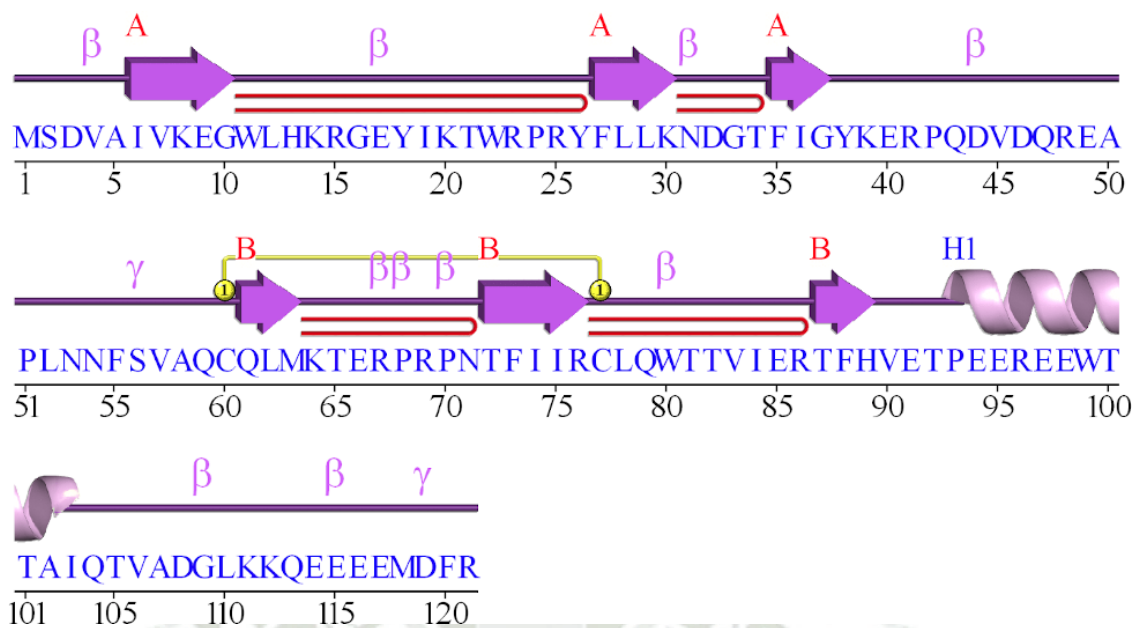
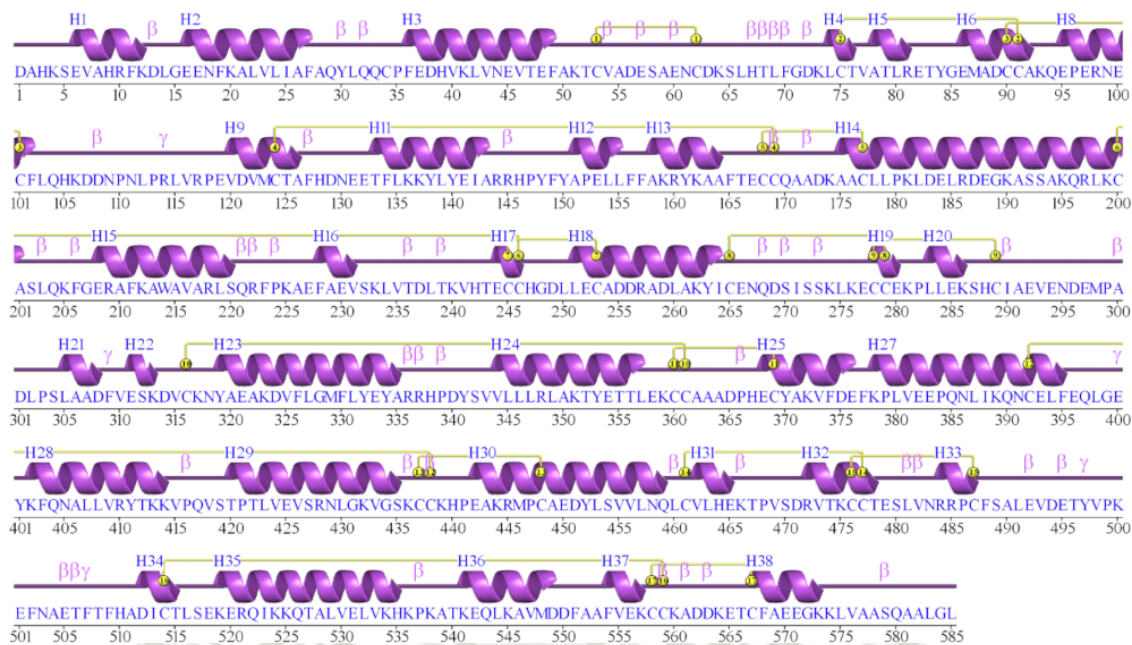


Figura B.1: Estructura secundaria equilibrada del AKT1



**Figura B.2:** Estructura secundaria equilibrada del ALB

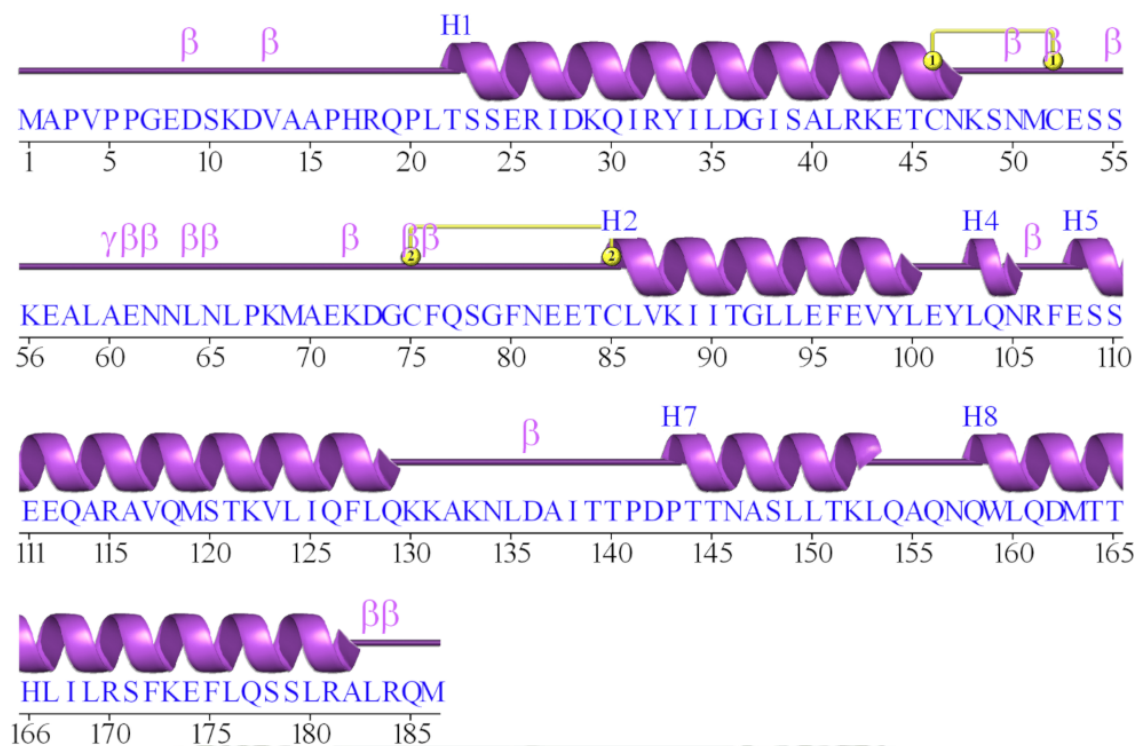


Figura B.3: Estructura secundaria equilibrada del IL6

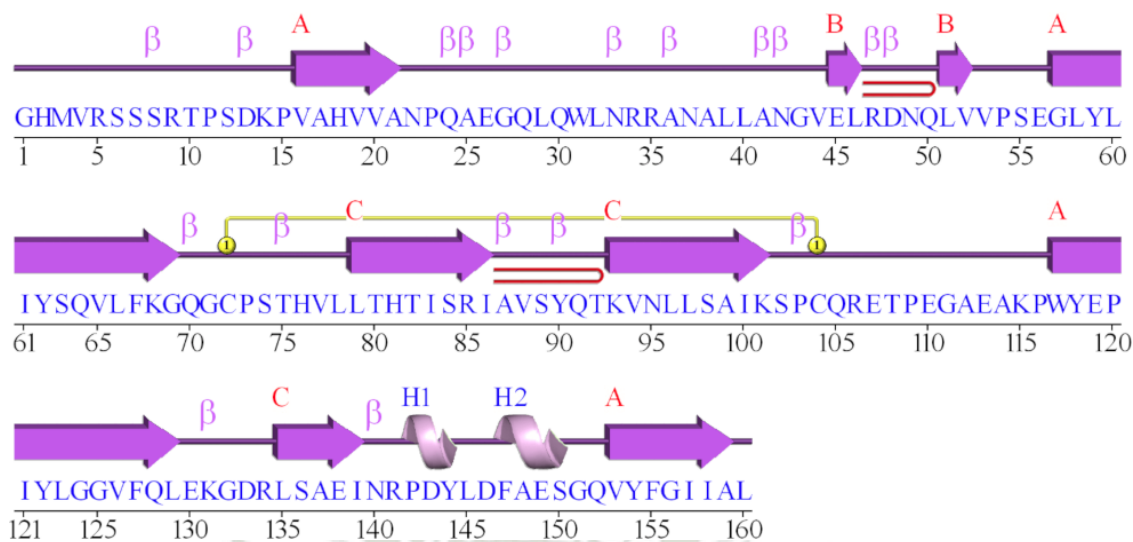


Figura B.4: Estructura secundaria equilibrada del TNF

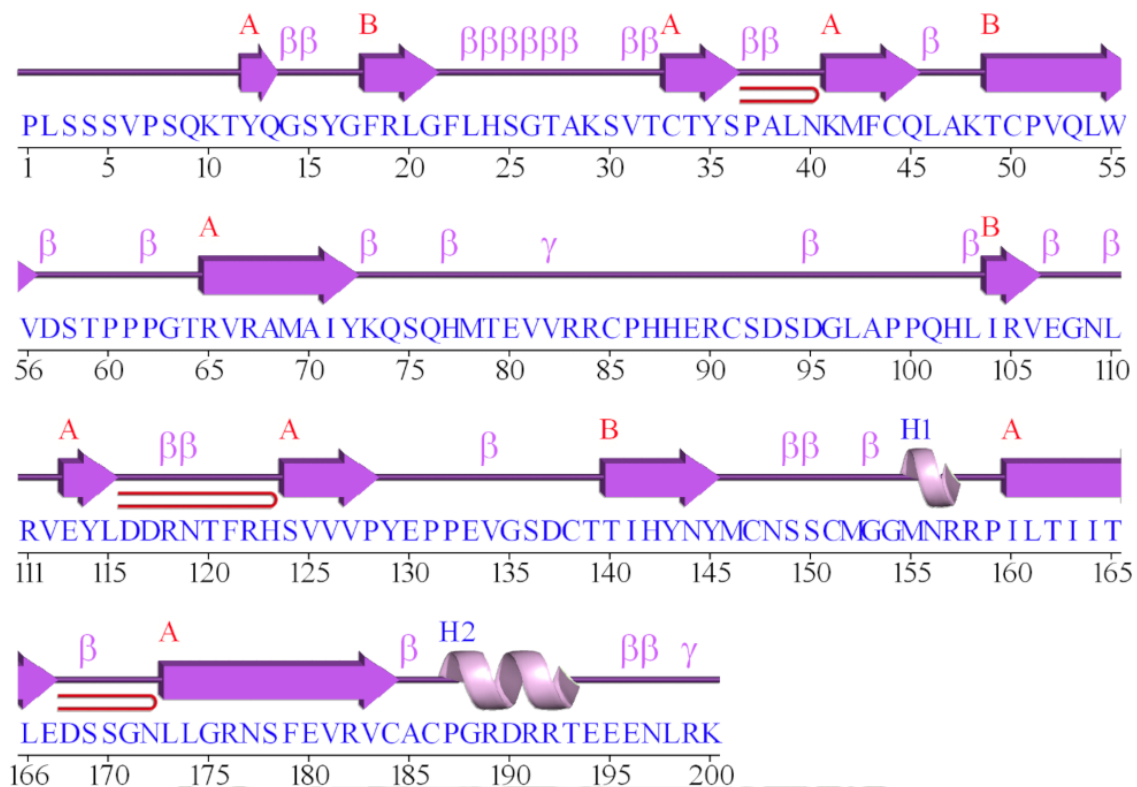


Figura B.5: Estructura secundaria equilibrada del TP53

## Apéndice C

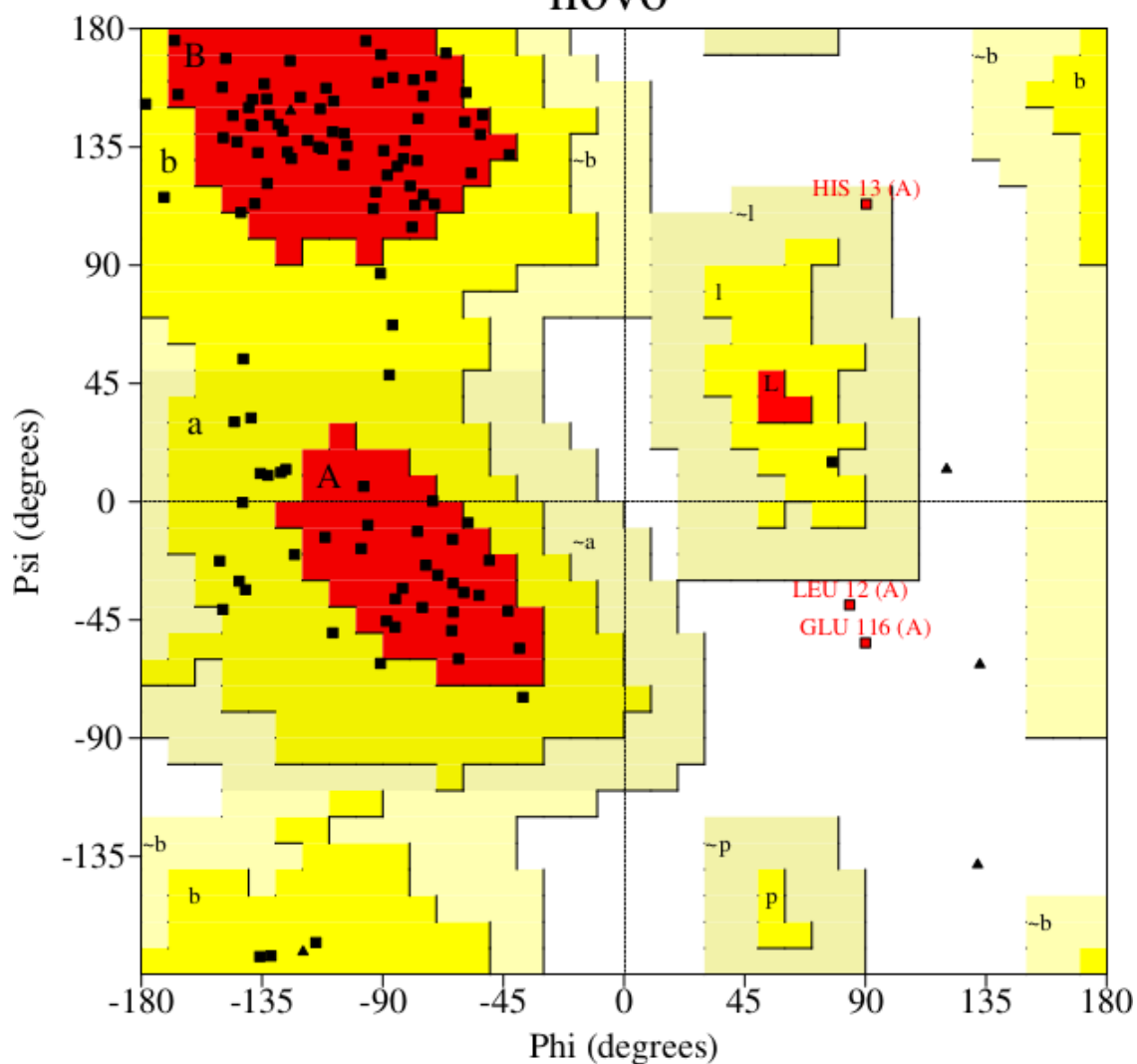
### Análisis de Ramachandran



PROCHECK

# Ramachandran Plot

## nov6



### Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	77	71.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	28	25.9%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.9%
Residues in disallowed regions	2	1.9%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	108	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	5	
Number of proline residues	6	
-----		
Total number of residues	121	

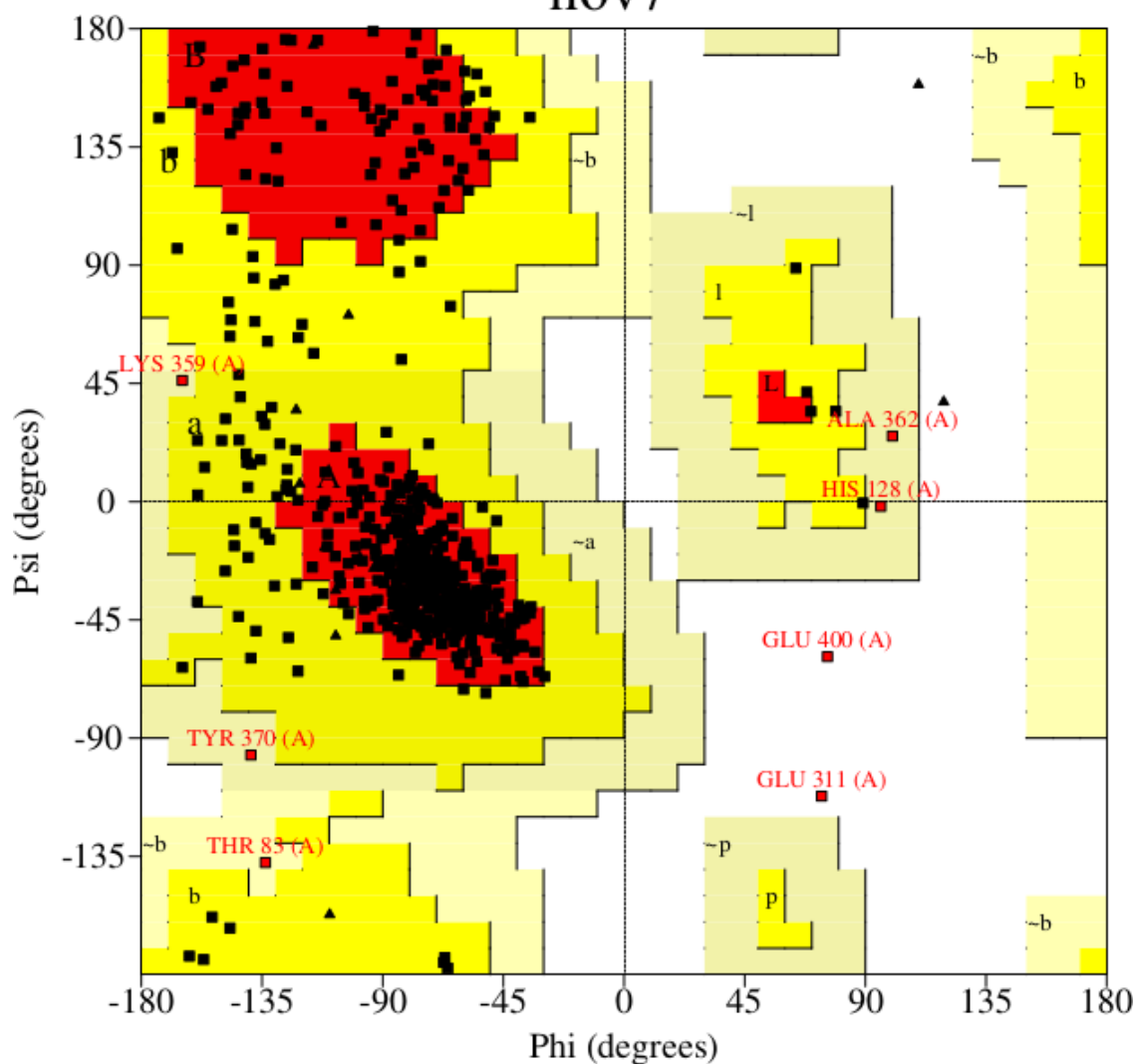
Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura C.1: Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada AKT1

PROCHECK

# Ramachandran Plot

nov7



## Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	451	82.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	89	16.3%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	5	0.9%
Residues in disallowed regions	2	0.4%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	547	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	12	
Number of proline residues	24	
-----		
Total number of residues	585	

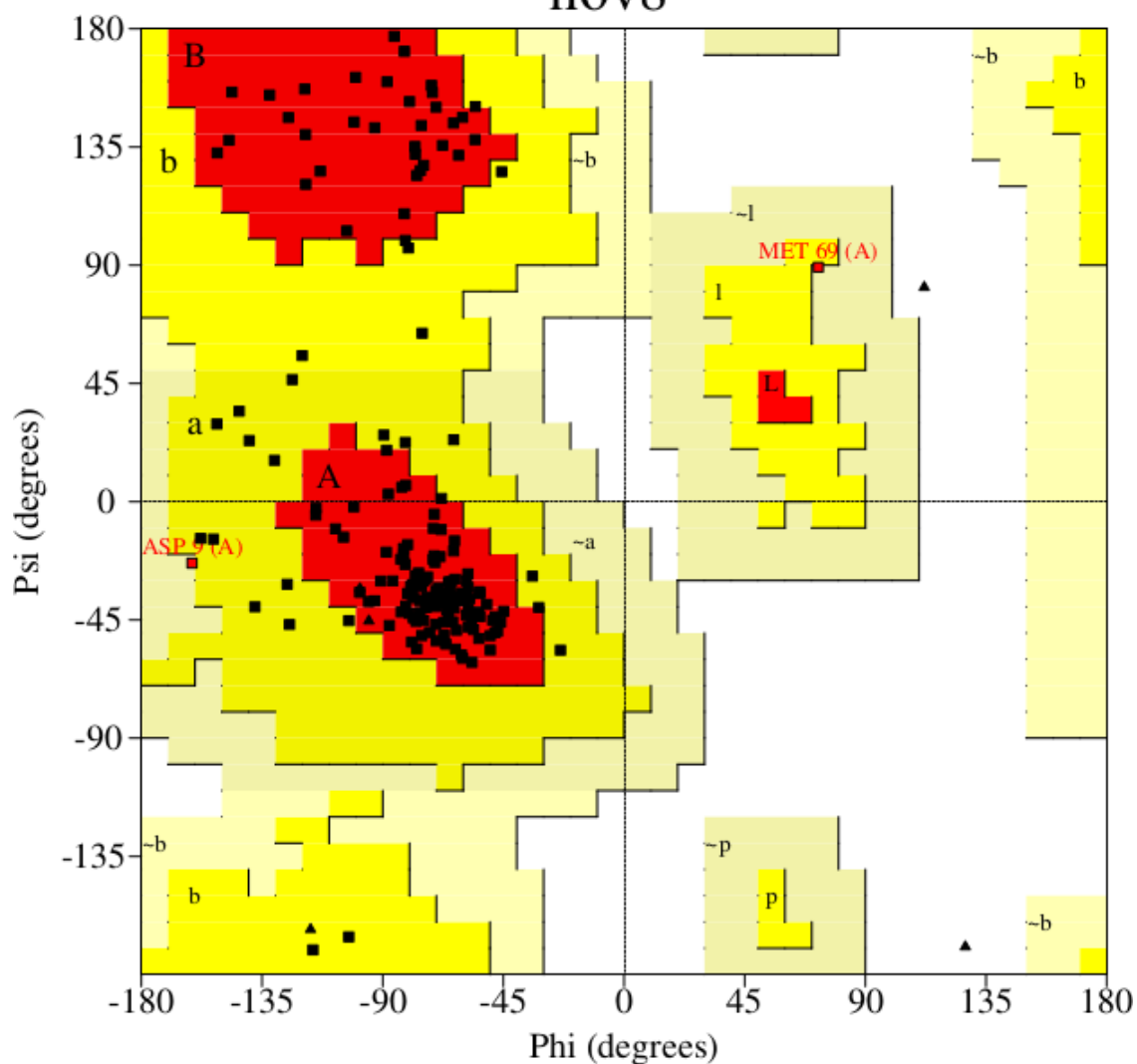
Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

**Figura C.2:** Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada ALB

PROCHECK

# Ramachandran Plot

nov8



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	146	85.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	23	13.5%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	2	1.2%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	171	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	5	
Number of proline residues	8	
-----		
Total number of residues	186	

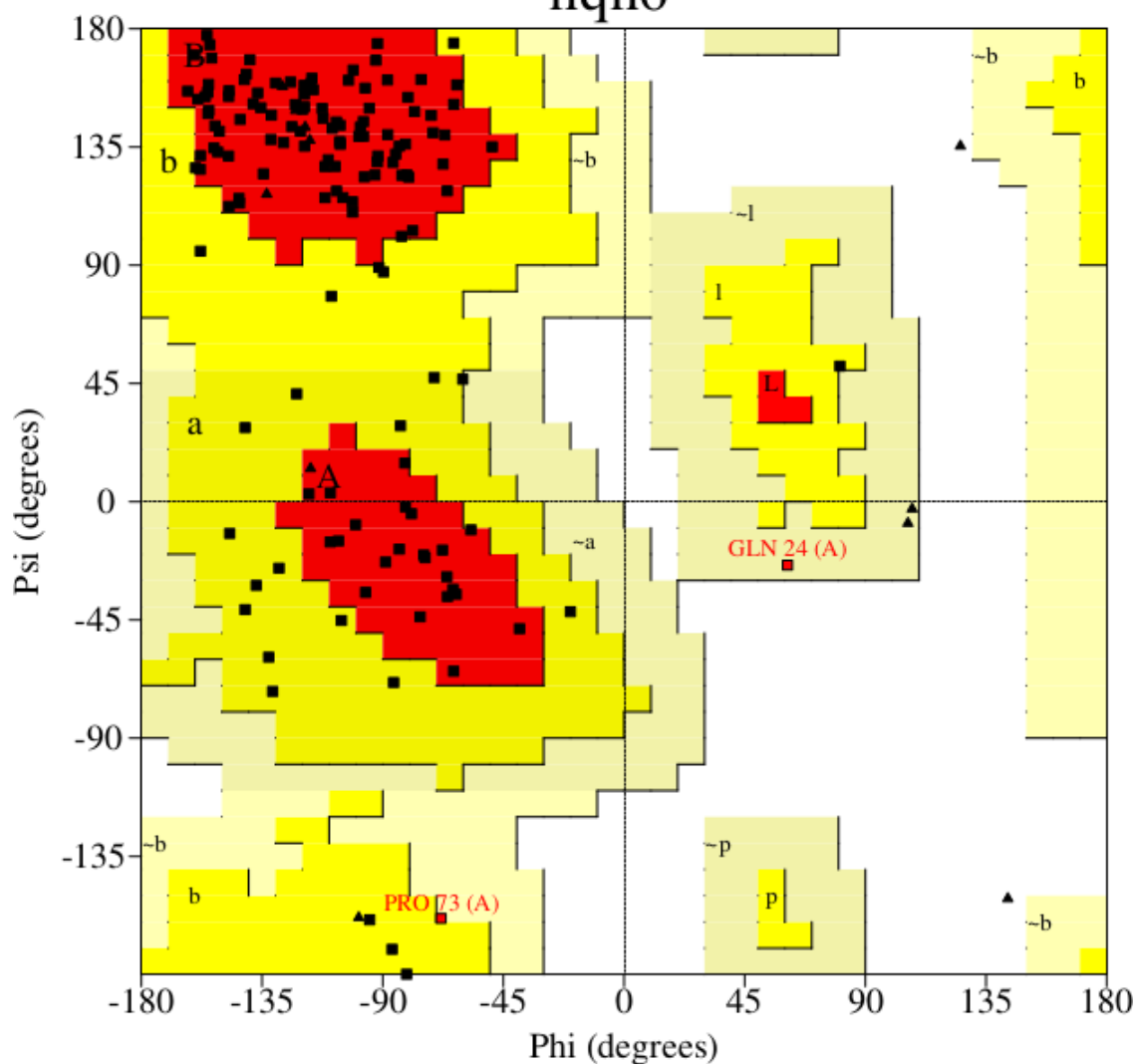
Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura C.3: Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada IL6

PROCHECK

# Ramachandran Plot

nqn6



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	114	83.2%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	22	16.1%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.7%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	137	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	1	
Number of glycine residues (shown as triangles)	12	
Number of proline residues	10	
-----		
Total number of residues	160	

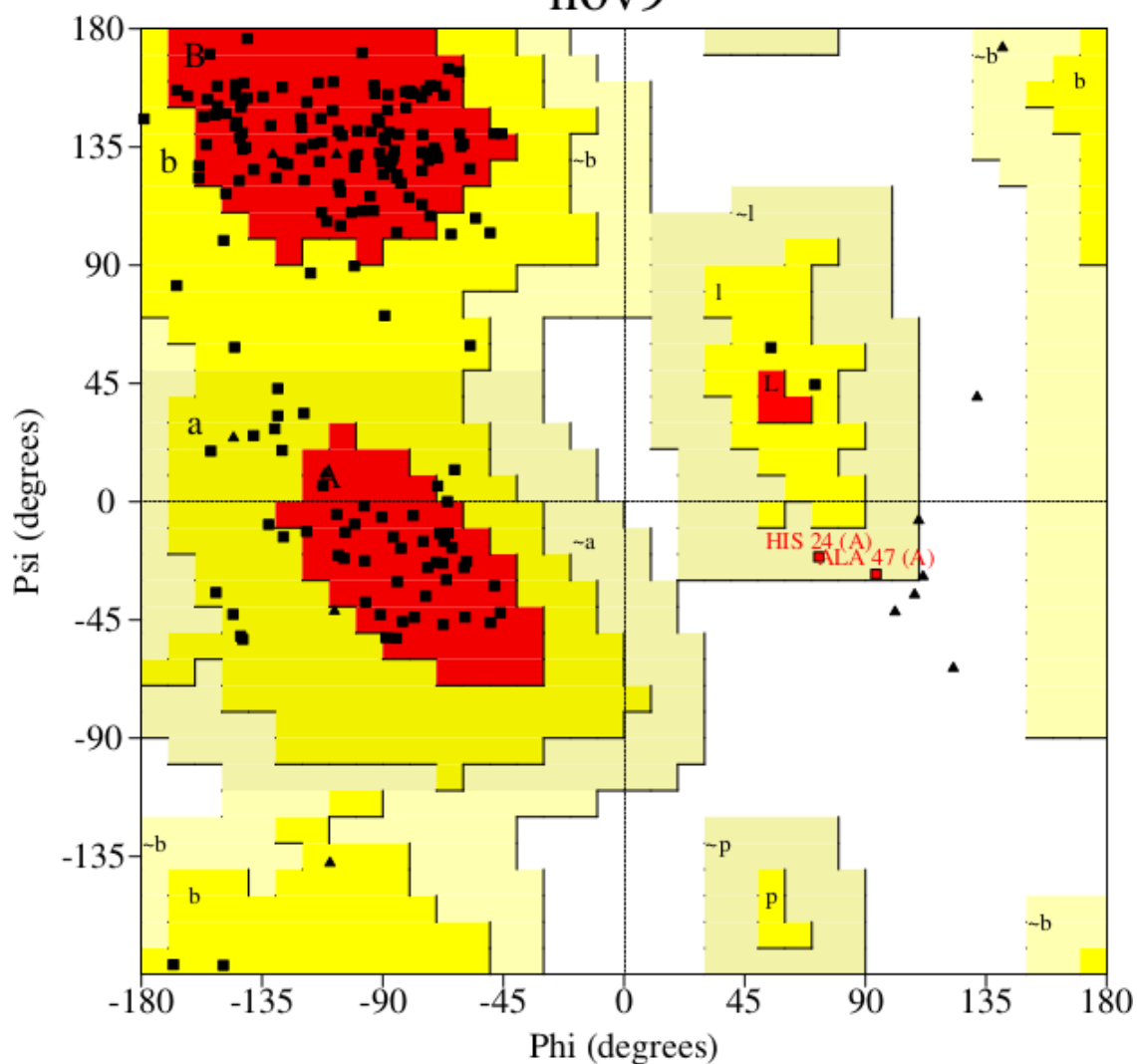
Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura C.4: Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada TNF

PROCHECK

# Ramachandran Plot

nov9



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	136	79.5%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	33	19.3%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	2	1.2%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	171	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	1	
Number of glycine residues (shown as triangles)	13	
Number of proline residues	15	
-----		
Total number of residues	200	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura C.5: Análisis de Ramachandran de la proteína equilibrada TP53