

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica**



**Evaluación del acoplamiento molecular de flavonoides naturales y un  
inhibidor sintético sobre la MMP-13 implicada en la degradación del  
colágeno tipo II para tratamientos de osteoartritis**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Chavez Melendez, Susan Elizabeth**

**ORCID: 0009-0005-5202-3348**

para optar el Título Profesional de Ingeniera Biotecnóloga

Asesor(a):

**Dr. Gómez Valdez, Badhin**

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

Arequipa – Perú

2025

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**INGENIERIA BIOTECNOLOGICA**  
**TITULACIÓN CON TESIS**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 31 de Julio del 2025

**Dictamen: 008269-C-EPIB-2025**

Visto el borrador del expediente 008269, presentado por:

**2018700492 - CHAVEZ MELENDEZ SUSAN ELIZABETH**

Titulado:

**EVALUACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE FLAVONOIDES NATURALES Y UN  
INHIBIDOR SINTÉTICO SOBRE LA MMP-13 IMPLICADA EN LA DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO  
TIPO II PARA TRATAMIENTOS DE OSTEOATRITIS**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

**INGENIERO BIOTECNOLOGO**

**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY  
DICTAMINADOR**



**45830984 - PAREDES ZAVALA JOSHELYN MARIANGELA  
DICTAMINADOR**



**42671615 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL  
DICTAMINADOR**



# EVALUACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE FLAVONOIDES NATURALES Y UN INHIBIDOR SINTÉTICO SOBRE LA MMP-13 IMPLICADA EN LA DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO TIPO II PARA TRATAMIENTOS DE OSTEOATRITIS

## INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	13%	4%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	2%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	2%
3	<a href="https://tesis.ucsm.edu.pe">tesis.ucsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="https://riaa.uaem.mx:8080">riaa.uaem.mx:8080</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="https://repositorio.ucsm.edu.pe">repositorio.ucsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="https://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="https://www.latamjpharm.org">www.latamjpharm.org</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="https://idoc.pub">idoc.pub</a> Fuente de Internet	<1%
9	Submitted to Universidad Carlos III de Madrid - EUR Trabajo del estudiante	<1%
10	<a href="https://doi.org">doi.org</a> Fuente de Internet	<1%
11	<a href="https://repositorio.uam.es">repositorio.uam.es</a> Fuente de Internet	<1%

### *Dedicatoria*

Dedico este trabajo de investigación a mi familia. A mi padre, Dennis, y a mi madre, Lorena, por ser un ejemplo constante de integridad, esfuerzo y perseverancia; y a mis abuelos, cuyo cariño incondicional ha sido siempre un sostén invaluable en mi vida.



### *Agradecimientos*

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Badhin Gomez, por su invaluable orientación y apoyo durante toda esta investigación. De manera personal, agradezco profundamente a mi familia y a mis abuelos, por su constante motivación y amor incondicional.

Finalmente, agradezco a Dios por estar siempre presente en mi vida y en mi corazón.



## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la interacción de cinco flavonoides de origen natural y un inhibidor sintético (CL-82198) con la metaloproteinasa de matriz MMP-13, mediante simulaciones de dinámica molecular. Los análisis estructurales, como el RMSD, RMSF y el radio de giro, evidenciaron la estabilidad de los complejos formados. Asimismo, los diagramas de Ramachandran confirmaron la conservación de conformaciones favorecidas a lo largo de la trayectoria de simulación. El cálculo de la energía libre de unión, realizado mediante el método MMPBSA, indicó que la Nicotiflorina (NIC) presentó el valor más favorable ( $-349,348 \pm 29,041$  kJ/mol), superando ligeramente al inhibidor sintético CL-82198 ( $-340,569 \pm 25,390$  kJ/mol). Estos resultados sugieren que NIC podría poseer un mayor potencial inhibitorio sobre la MMP-13, lo que sugiere su posible incorporación como componente funcional en dietas orientadas al control de la osteoartritis.

**Palabras clave:** MMP-13, osteoartritis, dinámica molecular.

## ABSTRACT

In the present study, the interaction of five naturally occurring flavonoids and a synthetic inhibitor (CL-82198) with matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) was evaluated through molecular dynamics simulations. Structural analyses, including RMSD, RMSF, and radius of gyration, demonstrated the stability of the formed complexes. Additionally, Ramachandran plots confirmed the maintenance of favored conformations throughout the simulation trajectory. The binding free energy, calculated using the MMPBSA method, showed that Nicotiflorin (NIC) exhibited the most favorable value ( $-349,348 \pm 29,041$  kJ/mol), slightly outperforming the synthetic inhibitor CL-82198 ( $-340,569 \pm 25,390$  kJ/mol). These results suggest that NIC may possess a greater inhibitory potential against MMP-13, supporting its potential incorporation as a functional dietary component in osteoarthritis management strategies.

**Key words:** MMP-13, osteoarthritis, molecular dynamics.

## ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS .....	3
OBJETIVOS.....	3
Capítulo 1 .....	4
MARCO TEÓRICO .....	4
1.1 La Osteoartritis .....	5
1.1.1 Impacto clínico y social.....	5
1.2 Fisiopatología de la Osteoartritis.....	6
1.2.1 Estructura del cartílago articular.....	6
1.2.2 Progresión de la enfermedad .....	9
1.3 Factores de Riesgo de la Osteoartritis .....	10
1.3.1 Factores biológicos (edad, sexo, genética).....	10
1.3.1.1 Edad.....	10
1.3.1.2 Género .....	11
1.3.1.3 Genética.....	12
1.3.2 Factores mecánicos y metabólicos .....	12
1.3.2.1 Lesiones.....	12
1.3.2.2 Obesidad.....	13
1.4 Contexto Clínico y Molecular de la Osteoartritis.....	13
1.4.1 Contexto clínico.....	13
1.4.1.1 Epidemiología.....	13
1.4.1.2 Limitaciones terapéuticas .....	13
1.4.2 Contexto molecular.....	14
1.4.2.1 Rol de la matriz extracelular.....	14
1.4.2.2 Metaloproteinasas de matriz (MMPs) .....	15
1.5 Inflamación en la osteoartritis .....	16
1.5.1 Inflamación de la membrana sinovial (sinovitis) y su impacto en la OA.....	17
1.5.2 Citoquinas y mediadores inflamatorios involucrados .....	19

1.5.2.1	Citoquinas proinflamatorias .....	19
1.5.2.2	Quimiocinas.....	20
1.5.2.3	Mediadores antiinflamatorios .....	20
1.5.3	Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en la inflamación .....	21
1.5.4	Interacción entre inflamación y degradación del cartílago.....	21
1.5.5	Interacción entre inflamación y hueso subcondrial .....	22
1.5.6	Otros factores que desencadenan la OA .....	22
1.6	Diagnóstico de la Osteoartritis .....	22
1.6.1	Evaluación del dolor.....	23
1.6.2	Técnicas de Imagen .....	23
1.6.3	Biomarcadores.....	24
1.7	Flavonoides como Agentes Terapéuticos.....	24
1.7.1	Introducción a los flavonoides.....	24
1.7.2	Clasificación y propiedades generales.....	25
1.7.3	Flavonoides naturales estudiados .....	25
1.7.3.1	Rutina.....	25
1.7.3.2	Nicotiflorina.....	26
1.7.3.3	Orientina .....	26
1.7.3.4	Vitexina .....	26
1.7.3.5	Apigetrina .....	26
1.7.4	Inhibidor selectivo sintético.....	27
1.7.4.1	Inhibidor CL-82198 .....	27
1.8	Química Cuántica Aplicada al Estudio Molecular .....	27
1.9	Mecánica Molecular y Simulación Computacional.....	28
1.9.1	Modelos Moleculares y Simulaciones.....	28
1.9.2	Evaluación Energética y Conformacional de Ligandos .....	29
1.10	Campos de Fuerza y Simulación Molecular.....	30
1.10.1	Principales Campos de Fuerza.....	32
1.10.1.1	AMBER.....	32
1.10.1.2	CHARMM.....	32
1.10.1.3	OPLS .....	32
1.10.1.4	GROMOS .....	33
1.10.2	Parámetros y Contribuciones Energéticas .....	33
1.10.2.1	Energía de Enlaces, Ángulos y Torsión.....	33

1.10.2.2	Interacciones de van der Waals y Electroestática.....	34
1.11	Interacciones Proteína-Ligando en Docking Molecular.....	35
1.12	La bioinformática en biotecnología.....	35
Capítulo 2	.....	37
METODOLOGÍA	.....	37
2.1	Detalles Computacionales .....	38
2.1.1	Hardware .....	38
2.1.2	Base de datos .....	38
2.1.2.1	PDB .....	38
2.1.2.2	PubChem .....	38
2.1.3	Servidores .....	39
2.1.3.1	GROMACS 2022.3 .....	39
2.1.3.2	UCSF Chimera .....	39
2.1.3.3	AutoDock Vina.....	39
2.1.3.4	Gaussian 16 y GaussView 6 .....	39
2.1.3.5	PDBSum.....	39
2.1.3.6	LigParGen.....	39
2.1.3.7	MMPBSA.....	40
2.1.3.8	APBS .....	40
2.2	Metodología.....	40
2.2.1	Extracción de la proteína .....	40
2.2.2	Modelado de la proteína .....	40
2.2.3	Edición del campo de fuerza OPLSAA para Zinc.....	41
2.2.3.1	Modificación del campo de fuerza .....	41
2.2.3.2	Definición de restricciones de distancia .....	42
2.2.3.3	Ajustes en el archivo de los parámetros de simulación (.mdp) .....	42
2.2.4	Cálculo de cargas atómicas.....	42
2.2.5	Simulación de Dinámica Molecular de la proteína .....	43
2.2.6	Estabilidad de la proteína .....	43
2.2.7	Extracción de flavonoides naturales y el sintético.....	43
2.2.8	Determinación de la complejidad.....	44
2.2.9	Acoplamiento molecular “Docking” .....	44
2.2.9.1	Minimización y equilibrio Proteína-Ligando .....	44
2.2.10	Análisis post-equilibrio.....	45

2.2.11	Análisis de energías de interacción .....	45
Capítulo 3	.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	.....	46
3.1	Estructura de la proteína .....	47
3.2	Estructura del complejo proteína-ligando respectivamente.....	58
CONCLUSIONES	.....	89
RECOMENDACIONES	.....	90
REFERENCIAS	.....	91



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura anatómica de una articulación sinovial. Creado con BioRender.com .	7
Figura 1.2 Esquema del cartílago articular. Creado con BioRender.com .....	9
Figura 1.3 Progresión de la Osteoartritis: La transición de una articulación sana (A) a una afectada por osteoartritis (B). Creado por BioRender.com .....	10
Figura 1.4 Interacciones enlazantes y no enlazantes en un campo de fuerzas de Mecánica Molecular. Creado con BioRender.com .....	31
Figura 3.1 Estructura 3ZXH bajada del servidor PDB.....	47
Figura 3.2 En la imagen se muestra la secuencia antes y después del completado por homología. ....	48
Figura 3.3 Representación tridimensional de la metaloproteinasa MMP-13 (ID: 3ZXH) obtenida mediante Chimera. ....	49
Figura 3.4 Estructura química de los metabolitos secundarios y del inhibidor sintético .....	51
Figura 3.5 Distancia de restricción empleada.....	52
Figura 3.6 Estructura 3ZXH al final de la Simulación de Dinámica Molecular. ....	53
Figura 3.7 RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular de la Proteína.....	54
Figura 3.8 RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular de la Proteína .....	55
Figura 3.9 Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular de la Proteína. ....	56
Figura 3.10 Diagrama de Ramachandran de la Simulación de Dinámica Molecular de la Proteína.....	56
Figura 3.11 APBS de la Proteína final después de Simulación de DM de la Proteína.....	57
Figura 3.12 Conformación más probable como resultado del Docking .....	59
Figura 3.13 Estructura y Potencial Electroestático del Complejo al final de la Simulación..	60
Figura 3.14 Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Rutina.....	61
Figura 3.15 Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Rutina.....	62

Figura 3.16 Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Rutina.....	63
Figura 3.17 Gráfica del Diagrama de Ramachandran de la simulación de la DM cuando interactúa con la Rutina .....	64
Figura 3.18 Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Apigetrina .....	65
Figura 3.19 Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Apigetrina .....	66
Figura 3.20 Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Apigetrina. ....	67
Figura 3.21 Gráfica del Diagrama de Ramachandran de la simulación de la DM cuando interactúa con la Apigetrina.....	68
Figura 3.22 Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Vitexina. ....	70
Figura 3.23 Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Vitexina. ....	71
Figura 3.24 Gráfica de Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Vitexina. ....	72
Figura 3.25 Gráfica del Diagrama de Ramachandran de la simulación de la DM cuando interactúa con la Vitexina. ....	73
Figura 3.26 Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Orientina.....	74
Figura 3.27 Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Orientina. ....	75
Figura 3.28 Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Orientina. ....	76
Figura 3.29 Gráfica del Diagrama de Ramachandran para la proteína al final de la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Orientina. ....	77
Figura 3.30 Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Nicotiflorina.....	78

Figura 3.31 Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Nicotiflorina..... 79

Figura 3.32 Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Nicotiflorina..... 80

Figura 3.33 Gráfica del Diagrama de Ramachandran para la proteína al final de la simulación de la dinámica molecular cuando interactúa con la Nicotiflorina..... 81

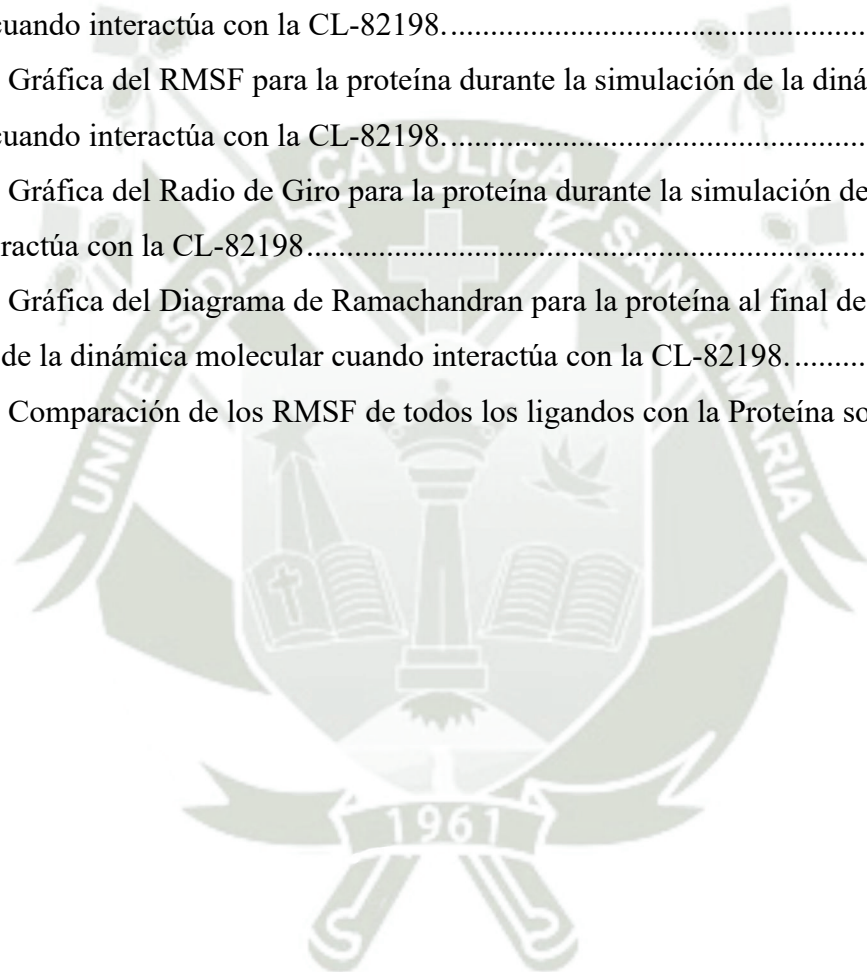
Figura 3.34 Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de la dinámica molecular cuando interactúa con la CL-82198..... 82

Figura 3.35 Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de la dinámica molecular cuando interactúa con la CL-82198..... 83

Figura 3.36 Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la CL-82198..... 84

Figura 3.37 Gráfica del Diagrama de Ramachandran para la proteína al final de la simulación de la dinámica molecular cuando interactúa con la CL-82198..... 85

Figura 3.38 Comparación de los RMSF de todos los ligandos con la Proteína sola ..... 86



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Métodos computacionales según el tipo de molécula o sistema estudiado. ....	29
Tabla 2.1 Parámetros principales del ión $Zn^{2+}$ .....	41
Tabla 2.2 Archivos modificados y cambios realizados .....	42
Tabla 3.1 Metabolitos secundarios y el compuesto sintético que fueron utilizados en el presente estudio. ....	50
Tabla 3.2 Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Rutina.....	65
Tabla 3.3 Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Apigetrina. ..	69
Tabla 3.4 Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Vitexina.....	73
Tabla 3.5 Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Orientina. ....	78
Tabla 3.6 Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Nicotiflorina. ....	82
Tabla 3.7 Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la CL-82198....	85
Tabla 3.8 Contribuciones energéticas a la energía libre de interacción de los complejos en kJ/mol. ....	85

## INTRODUCCIÓN

La Osteoartritis (OA) es conocida como una patología articular altamente prevalente a nivel mundial. Es caracterizada comúnmente por la pérdida progresiva del cartílago en las articulaciones y actualmente no existe una cura conocida para esta condición (1)(2). Esto viene causando problemas significativos en la población que clínicamente son manifestados con dolor articular e hinchazón. Afectando así, la calidad de vida de las personas por los efectos funcionales limitantes y la discapacidad motora progresiva asociada con el lento avance de la enfermedad (3)(4). Por otro lado, además de ser una preocupación médica importante, la OA impone un alto costo económico global debido a los gastos asociados con su tratamiento y manejo continuo (5)(6).

Inicialmente, la OA estaba relacionada directamente con el envejecimiento, pero en realidad su patogenia es multifactorial. Implica factores de riesgo modificable, como la obesidad y los hábitos dietéticos; así como factores no modificables, género y predisposición genética (7)(8).

Además, la OA también puede desarrollarse tras una lesión traumática aguda, a través de una respuesta inflamatoria temprana que actúa como un fenómeno fisiopatológico inicial (9)(10).

Esta respuesta inflamatoria desempeña un papel crucial en la restauración de la homeostasis que, al no ser regulada adecuadamente, puede evolucionar hacia una inflamación crónica. Esto contribuye al desarrollo de diversas condiciones patológicas, afectando al cuerpo sin presentar necesariamente síntomas evidentes (11)(12)(13). En este sentido, la matriz extra celular (MEC) juega un papel fundamental en la integración y función del cartílago articular (CA) (14)(15).

Dentro de los numerosos procesos que regulan la MEC, los condrocitos desempeñan un papel crucial al producir varias metaloproteinasas de matriz (MMPs), siendo la MMP-13 una de las más importantes debido a su capacidad para degradar al colágeno tipo II, un componente clave del cartílago (16). Este proceso es natural. Sin embargo, un desequilibrio entre la actividad de las MMPs y de sus inhibidores naturales, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), es favorecido por factores inflamatorios, y además puede contribuir a la degradación acelerada del cartílago, favoreciendo la progresión de la OA (17). Las MMPs provienen de una gran familia de endopeptidasas y son dependientes del zinc. Lo que no sólo es crucial para la actividad catalítica, sino que su coordinación es fundamental para la estabilidad estructural de la enzima. La importancia para la inhibición de la MMP-13 radica en su potencial para proteger la integridad del

cartílago y frenar la progresión de la OA. Al reducir la actividad de esta metaloproteinasa, se puede disminuir la degradación del colágeno tipo II, lo que contribuye a mantener la estructura y función del cartílago articular. Esto representa un objetivo interesante para el desarrollo de fármacos terapéuticos (18)(19).

Este estudio se centra en la evaluación computacional de la interacción de la MMP-13 con flavonoides naturales y uno sintético. La comprensión de estas interacciones es fundamental para explorar posibles estrategias inhibitorias basadas en simulaciones de dinámicas moleculares (DM). En particular, se analizan las múltiples interacciones de los metabolitos que influyen en la expresión de MMP-13, enfocándose en contribuir a la identificación de potenciales inhibidores de MMP-13 que podrían ser relevantes en el desarrollo de tratamientos para la OA. El estudio de flavonoides adquiere relevancia debido a su abundante presencia en alimentos de origen vegetal, particularmente en el contexto de la dieta mediterránea. Además, este modelo alimentario, altamente respaldado por investigaciones científicas durante los últimos 50 años, ha demostrado tener un impacto significativo en la salud humana. Y los flavonoides, presentes en frutas, verduras y productos como el aceite de oliva extra virgen, se han asociado con los diversos beneficios nutricionales y efectos protectores frente a enfermedades crónicas (20).

## HIPÓTESIS

Los flavonoides naturales presentan una posible capacidad inhibitoria frente a la MMP-13, enzima clave en la degradación del cartílago durante la osteoartritis, comparable a la del inhibidor sintético CL-82198, lo que resalta su potencial como alternativas terapéuticas accesibles mediante la dieta.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar el potencial de capacidad inhibitorio de cinco flavonoides naturales frente a la metaloproteinasa MMP-13 mediante simulaciones de dinámica molecular, comparando sus propiedades estructurales y energéticas con el inhibidor sintético CL-82198.

### Objetivos Específicos

1. Obtener y preparar las estructuras tridimensionales de los flavonoides naturales, del inhibidor sintético CL-82198 y de la metaloproteinasa MMP-13, mediante bases de datos públicas y herramientas de modelado estructural.
2. Realizar acoplamiento molecular entre los ligandos y la MMP-13 para predecir los modos de unión y estimar la afinidad energética de cada complejo.
3. Ejecutar simulaciones de dinámica molecular a 200 ns para evaluar la estabilidad estructural de los complejos formados entre MMP-13 y cada ligando.
4. Analizar los perfiles estructurales y dinámicos de los complejos mediante parámetros como RMSD (Desviación cuadrática media), RMSF (Fluctuación Cuadrática Media o Root Mean Square Fluctuation), RG (Radio de giro) y diagramas de Ramachandran.
5. Estimar la energía libre de unión mediante el método MMPBSA e identificar las interacciones clave entre MMP-13 y cada compuesto, con el fin de seleccionar el flavonoide con mayor potencial terapéutico.



# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

## 1.1 La Osteoartritis

La osteoartritis (OA) es la forma más común de artritis y una enfermedad articular crónica caracterizada por la pérdida progresiva del cartílago articular y la remodelación ósea anormal (21)(22)(23). No obstante, el concepto tradicional de OA como una simple enfermedad degenerativa o de “desgaste” ha quedado obsoleto, puesto que viene a ser un tema más complejo. Actualmente, se define como una “enfermedad progresiva de las articulaciones sinoviales”, esto representa una reparación fallida del daño articular. Por consiguiente, es resultante de tensiones iniciadas por anomalías en cualquiera de los tejidos de la articulación sinovial (24). Entonces, este proceso degenerativo no solo involucra factores mecánicos, sino también, factores inflamatorios y metabólicos (25). Por lo tanto, sus daños progresivos en las articulaciones incluyen la degradación del cartílago articular, inflamación de la membrana sinovial, alteraciones en el hueso subcondral, formación de osteofitos y cambios en el líquido sinovial (4). Estos efectos combinados deterioran la funcionalidad articular, causando dolor, rigidez y pérdida de movilidad, especialmente en la población de los adultos mayores.

Las articulaciones comúnmente más afectadas incluyen la rodilla, la mano y la cadera (26)(27). Su prevalencia varía según la edad, el país de origen y el género de la población.

### 1.1.1 *Impacto clínico y social*

La OA tiene como principal causa la discapacidad a nivel mundial, principalmente en adultos mayores.

Su padecimiento general causa el dolor articular crónico y afecta así la calidad de vida de las personas al tener una pérdida progresiva de la función articular. Esto se agrava por la inactividad que, es tanto un síntoma como un factor de riesgo, y puede empeorar con el tiempo. Además, se ha demostrado que los pacientes con OA tienen una mayor probabilidad de sufrir otras enfermedades, como las cardiovasculares, diabetes, presión arterial alta, osteoporosis, y trastornos de salud mental, como depresión y ansiedad (26). Sucesivamente, al incrementarse el dolor crónico que llega a ser constante y persistente, se optan por tratamientos que resultan ser costosos a largo plazo. Estos tratamientos que se siguen conllevan a una gran carga económica y emocional, donde no siempre el tratamiento es el adecuado (22). Además, existen factores de riesgo que pueden agravar la situación, como, por ejemplo, la obesidad. Aunque los costos asociados incluyen tratamientos

médicos, también existen intervenciones quirúrgicas y gastos indirectos como la pérdida laboral y cuidados prolongados. También se ha comprobado que existe una relación directamente proporcional entre el dolor musculoesquelético y el aislamiento social, donde los dolores causados por la OA producen reducción la movilidad y, por tanto, el aumento del riesgo de aislamiento social. Todo esto incluye ansiedad, depresión, inactividad física y kinesiofobia (28).

## 1.2 Fisiopatología de la Osteoartritis

La OA como enfermedad degenerativa degrada progresivamente el Cartílago Articular (CA) con cambios en el hueso subcondral, inflamación sinovial y formación de osteofitos. Mediante factores mecánicos, inflamatorios y metabólicos se contribuye al daño y, por ende, al dolor y rigidez (29).

### 1.2.1 Estructura del cartílago articular

El cartílago articular (CA) es un tipo especializado de cartílago hialino que actúa como un tejido conectivo único y multifacético para resistir los exigentes entornos biomecánicos en los que opera. Su estructura especializada cubre y protege los extremos de los huesos de las articulaciones sinoviales (30)(31). Esto proporciona resistencia mecánica de baja fricción en superficies de deslizamiento y cizallamiento, permitiendo movimientos suaves, al tiempo que absorbe fuerzas de compresión de manera eficiente (31). Su función principal es permitir que las articulaciones se muevan de manera fluida y sin fricción, asegurando así una distribución de cargas del peso corporal (32).

El menisco, que se encuentra dentro del CA, es una estructura clave en la articulación de la rodilla que ayuda a distribuir las cargas de compresión vertical transformándolas en tensiones circunferenciales, conocidas como tensiones de aro, lo que evita el daño en el cartílago articular. Estas tensiones circunferenciales se generan gracias a la forma y composición del menisco, permitiendo que absorba y redistribuya las fuerzas de manera uniforme. Su función incluye la absorción amortiguadora de impactos, la lubricación, la nutrición del cartílago, la propiocepción y el mantenimiento de la estabilidad articular (33).

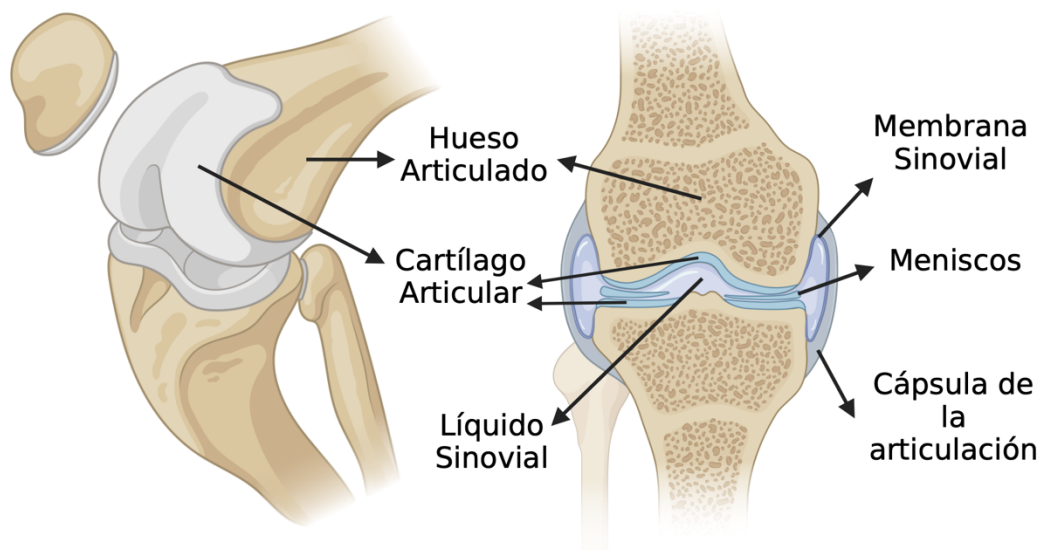
Como el CA es sometido a constantes movimientos y cargas, viene a ser un tejido único que no contiene nervios, vasos sanguíneos ni linfáticos (34), por ello, el CA depende del líquido sinovial

(LS) para su nutrición, lubricación y reparación. Es así que, durante la niñez, recibe nutrientes del suministro vascular del hueso subcondral; sin embargo, en la adultez, pierde esta conexión vascular, quedando el LS como su única fuente de nutrientes a través de la superficie articular, lo que limita su capacidad de recuperación (35).

El CA, también, está compuesto por una matriz extracelular (MEC) densa que contiene células especializadas, los condrocitos, los cuales representan entre el 1% y el 5% del volumen total del tejido (36). La MEC del cartílago articular está formada principalmente por agua, colágeno y proteoglicanos, acompañados de pequeñas proporciones de glucoproteínas y proteínas no colágenas, que ayudan a estabilizar su estructura tridimensional. Esta composición permite mantener el agua dentro de la matriz, lo cual es crucial para conservar sus propiedades mecánicas distintivas y su capacidad de resistir fuerzas mecánicas (34). Como se puede observar en la Figura 1.1, los componentes principales son: huesos articulados recubiertos por cartílago articular, líquido sinovial en la cavidad articular, membrana sinovial, cápsula de la articulación y meniscos. Y cada elemento contribuye a la función biomecánica y la estabilidad de la articulación.

**Figura 1.1**

Estructura anatómica de una articulación sinovial.



Fuente: Elaboración propia con BioRender.com

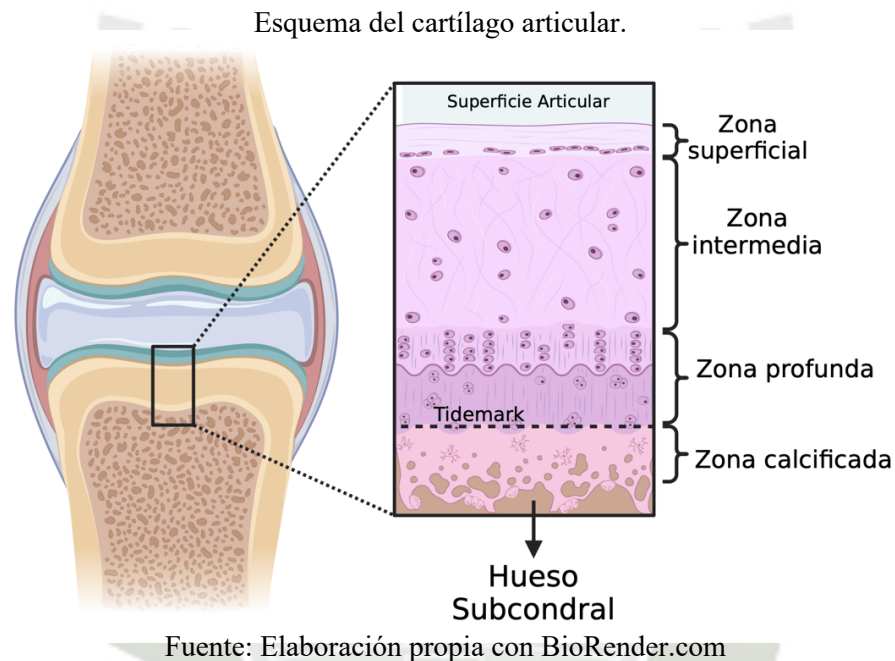
Las células clave en la OA son los condrocitos, estas células son las encargadas de mantener y regular el equilibrio de la matriz extracelular (MEC) en el CA. Estas células lo hacen mediante la

producción y secreción de componentes esenciales de la MEC, como el colágeno tipo II, que proporciona estructura y resistencia, y los proteoglicanos agregadores, como el agregcano, que contribuyen a la retención de agua y a las propiedades mecánicas del tejido (37). La MEC está compuesta principalmente por agua, que representa hasta un 80% de su volumen, junto con colágeno tipo II y proteoglicanos. Este proceso es crucial para preservar la integridad funcional del cartílago articular, especialmente en un entorno sometido a constantes cargas mecánicas y estrés. Por otro lado, el cartílago articular está formado por cuatro zonas que trabajan juntas para cumplir diferentes funciones.

- **Zona superficial:** Es la capa más externa del cartílago, está en contacto directo con el líquido sinovial. Compuesta por fibras de colágeno más densamente empaquetado y condrocitos alargados que parecen aplanados paralelos a la superficie articular (38). Esta capa es esencial para resistir las fuerzas de compresión, balanceo, giros y deslizamientos artrocinemáticos (35).
- **Zona media:** Debajo de la zona superficial. Hay condrocitos que actúan como un amortiguador entre la zona superficial y la profunda, ya que, estos son más grandes, de ovoides a redondos, y están dispersos de manera oblicua (39). Debido a su disposición no aplanada, los condrocitos contienen grandes cantidades de glucógeno y filamentos intracitoplasmáticos que contribuyen a mantener la estructura de la MEC. Además, los proteoglicanos se unen a las fibrillas más gruesas de colágeno, facilitando la retención de agua, mejorando la resistencia a la compresión y proporcionando soporte estructural (38).
- **Zona profunda:** Conecta el cartílago con el hueso subcondral (40) porque es la que absorbe la mayor parte de la presión y garantiza que el cartílago se mantenga estable y firme en su lugar. Los condrocitos tienen forma esferoideal y están organizados en columnas perpendiculares a la superficie, lo que mejora la resistencia a la compresión (41). La matriz extracelular contiene colágeno tipo II y proteoglicanos, esenciales para absorber cargas. La línea de marea (tide mark) representa el límite entre el cartílago no calcificado y el cartílago calcificado. La capa acelular marca la transición hacia el hueso subcondral, el cual tiene una resistencia mecánica menor en comparación con el cartílago (41).
- **Zona calcificada:** La zona calcificada contiene pocas células con escaso citoplasma y retículo endoplásmico, lo que las hace casi disfuncionales y con baja actividad metabólica. Su principal función es conectar el hueso subcondral con la zona profunda, asegurando una

transición efectiva en la distribución de cargas mecánicas. Esta conexión se da gracias a los cristales de hidroxapatita, que proporcionan estabilidad estructural (38)(41). En la Figura 1.2, se representan las cuatro zonas principales del cartílago articular (superficial, intermedia, profunda y calcificada) y su conexión con el hueso subcondral. La línea tidemark delimita la transición entre el cartílago no calcificado y calcificado.

**Figura 1.2**



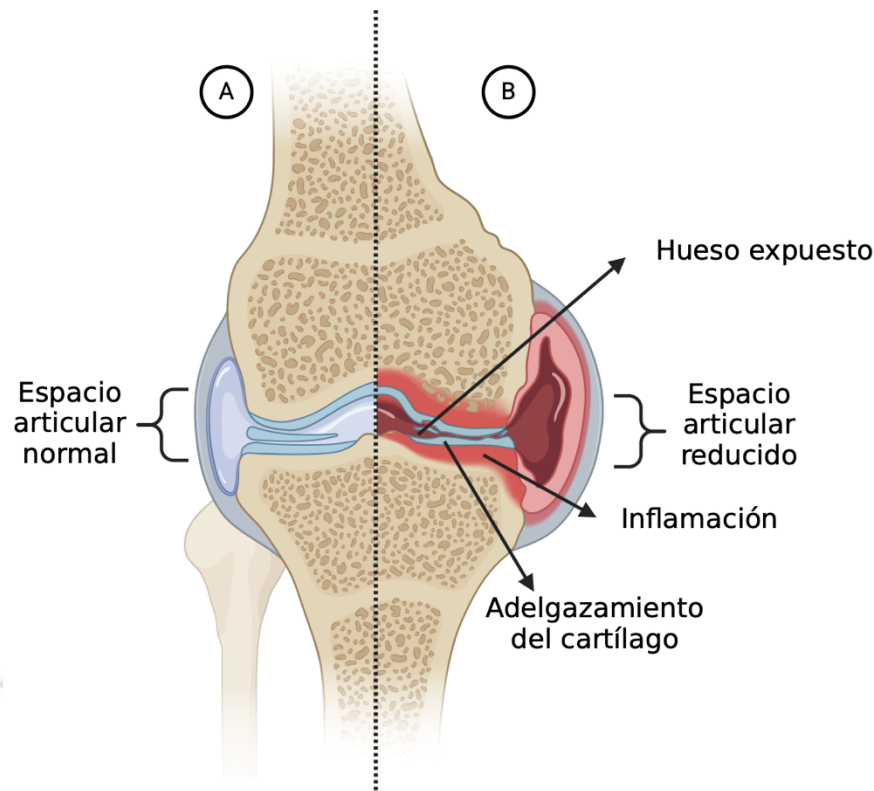
### **1.2.2 Progresión de la enfermedad**

La progresión de la osteoartritis es un proceso complejo y multifactorial en el que se producen cambios en la estructura y función de las articulaciones afectadas. El cartílago articular adulto tiene una capacidad limitada de regeneración debido a su hipovascularidad. El envejecimiento o uso excesivo provoca una actividad catabólica anormal de los condrocitos, lo que degrada la matriz extracelular, altera la homeostasis articular y desencadena una respuesta inflamatoria en los tejidos de la articulación conforme va pasando el tiempo (42). Desde la Figura 1.3, se puede observar que en el lado sano, el cartílago articular se encuentra intacto, manteniendo un espacio articular amplio que permite movimientos fluidos y sin fricción. En el lado afectado, se observa el adelgazamiento progresivo del cartílago debido a la degradación de la MEC, acompañado de una respuesta

inflamatoria en los tejidos periarticulares. Esto lleva a una reducción del espacio articular y a la exposición del hueso subcondral, lo que incrementa la fricción y puede causar dolor.

**Figura 1.3**

Progresión de la Osteoartritis: La transición de una articulación sana (A) a una afectada por osteoartritis (B).



Fuente: Elaboración propia con BioRender.com

### 1.3 Factores de Riesgo de la Osteoartritis

Esta enfermedad no surge de un único desencadenante, sino de la interacción o combinación de diversos elementos biológicos, mecánicos y metabólicos.

#### 1.3.1 Factores biológicos (edad, sexo, genética)

##### 1.3.1.1 Edad

La edad está estrechamente relacionada con la OA, especialmente a partir de los 65 años (43)(44). Con el envejecimiento ocurren cambios biológicos en las estructuras articulares que afectan al equilibrio homeostático de la matriz extracelular (MEC) y desencadenan procesos de

degradación y mecanismos de reparación limitada en el CA (21)(42)(45). Debido a la inmunosenescencia (interacción perjudicial en el sistema inmunológico que acompaña al envejecimiento humano), el sistema inmune no solo experimenta un deterioro general en su función, sino que también sufre una desregulación específica en la respuesta inmune adaptativa. Esto significa que, con la edad, el sistema inmune no solo se vuelve menos eficiente, sino que también pierde la capacidad de adaptarse correctamente a las amenazas, como infecciones o inflamaciones. Hasta el momento no hay una teoría que explique por completo el envejecimiento (46). Aunque se caracteriza por la acumulación de células senescentes en muchos tejidos. Se postula, a nivel celular, que este proceso está relacionado con el daño mitocondrial, el estrés oxidativo, la disfunción endocrina y los cambios epigenéticos, todos ellos relacionados con la inflamación crónica debido a la incapacidad de mantener la homeostasis, donde una de las células más afectadas son los condrocitos.

Entonces, el envejecimiento en la OA abarca efectos reflejados en la funcionalidad del cuerpo como la disminución de la función inmunológica, la acumulación de daño celular, la falla de los mecanismos de reparación tisular y los trastornos neurológicos (47). Además, factores como la pérdida de musculatura o la disfunción del sistema nervioso central y periférico, propios del envejecimiento, pueden acelerar la progresión de la OA al afectar los músculos que activan correctamente a las articulaciones (48).

### *1.3.1.2 Género*

Se ha evidenciado que las diferencias de género también afectan en el desarrollo de la OA de manera natural, el sexo femenino tiene mayor susceptibilidad, especialmente en la época de la menopausia, ya que las mujeres sufren con más dolores debilitantes que los hombres (49)(50)(51). Se estudiaron posibles efectos significativos relacionados con las hormonas como el estrógeno, pero esta revisión no es concluyente(52). Aunque, se ha observado que los estrógenos ejercen efectos protectores sobre el cartílago al participar en la regulación de su metabolismo, su disminución durante la menopausia podría explicar la mayor progresión de la OA en mujeres junto con otros factores (53). Entonces, se deduce que su relación con el género sería multifactorial, involucrando factores hormonales, anatómicos y genéticos, así como diferencias en el estilo de vida, actividades físicas y exposición a ciertos riesgos a lo largo del tiempo, que pueden influir en la prevalencia y gravedad de la OA (51). Además, también influye que las mujeres tienen diferente

morfometría articular, sus patrones de movimiento son diferentes con mayor trabajo mecánico y reflejan diferente grado de percepción con referente al dolor (49)(51).

### *1.3.1.3 Genética*

La influencia de los factores genéticos en el desarrollo de la OA contribuye, al menos, en un 30% al riesgo general de padecer la enfermedad (54). Sin embargo, este porcentaje varía significativamente según la articulación afectada. Estudios recientes indican que la predisposición genética desempeña un papel más determinante en la OA de cadera y mano, donde se ha estimado una heredabilidad de aproximadamente 60%. En contraste, la OA de rodilla, que muestra una menor influencia genética, con una heredabilidad estimada del 40%, siendo más susceptible a factores ambientales y biomecánicos, como la obesidad, las lesiones previas y la sobrecarga articular (55)(56). Además, se han identificado numerosos genes asociados con la incidencia y progresión de la OA, cada uno de los cuales contribuye con un efecto pequeño al riesgo individual (44)(54). La gran mayoría de estas variantes genéticas se localizan en regiones no codificantes del genoma, donde se presume que actúan regulando la expresión de genes relacionados con procesos como la estructura del cartílago, la inflamación y el metabolismo óseo (57). Sin embargo, la complejidad de la OA sugiere que las interacciones gen-ambiente también desempeñan un papel crucial (54).

### *1.3.2 Factores mecánicos y metabólicos*

Ambos factores crean un entorno de desarrollo y progresión de la OA, donde el estrés físico y las alteraciones bioquímicas aceleran el daño articular.

#### *1.3.2.1 Lesiones*

En el caso de la OA, la ruptura del ligamento cruzado anterior (LCA) constituye una de las lesiones articulares más severas. Estas lesiones suelen afectar también otras partes importantes de la rodilla, como el cartílago articular, el hueso subcondral y los ligamentos colaterales y, especialmente, en los meniscos. A pesar de los avances en la comprensión de las patologías articulares, los mecanismos precisos que vinculan la ruptura del LCA con el desarrollo acelerado de la OA aún no están completamente definidos. Se cree que las fuerzas extremas necesarias para dañar el LCA también causan lesiones ocultas en el cartílago y el hueso y que cuando la lesión del LCA se

combina con daño meniscal, la prevalencia de OA aumenta significativamente, situándose entre el 21% y 40% (55).

#### *1.3.2.2 Obesidad*

Se caracteriza como una enfermedad comórbida que contribuye al desarrollo de la OA, la cual comparte estrechos vínculos con la diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina, la dislipidemia y la hipertensión. Puesto que, la inflamación crónica de bajo grado y la resistencia a la insulina actúan como factores comunes que conectan estas comorbilidades (44). Además, el peso que soportan las articulaciones somete a los condrocitos a un estrés mecánico, lo que desencadena la inhibición de la síntesis de la matriz cartilaginosa y la liberación de factores proinflamatorios y degradantes, como COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MMP-3, MMP-13 y agregasa (ADAMTS) (22).

### **1.4 Contexto Clínico y Molecular de la Osteoartritis**

#### *1.4.1 Contexto clínico*

##### *1.4.1.1 Epidemiología*

La epidemiología se encarga de estudiar la distribución y los determinantes de los procesos de salud y enfermedad en poblaciones, permitiendo no solo monitorear su estado y evolución, sino también identificar factores de riesgo asociados. Este enfoque resulta clave para el desarrollo de estrategias eficaces que promuevan la prevención y el control de enfermedades, contribuyendo a la mejora de la salud pública. En el caso de la OA, como se identificó en puntos anteriores, diversos estudios han evidenciado que se trata de una enfermedad altamente prevalente, particularmente en adultos mayores, mujeres y poblaciones con factores de riesgo como la obesidad. No obstante, aún persisten lagunas en la comprensión de ciertos determinantes específicos de su epidemiología (3). Entre los factores modificables más destacados se encuentran el sobrepeso y las lesiones articulares, cuya adecuada intervención podría contribuir significativamente a prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad (58).

##### *1.4.1.2 Limitaciones terapéuticas*

La falta de una comprensión completa sobre los procesos biológicos y moleculares implicados en la OA limita el desarrollo de tratamientos efectivos. Actualmente, las terapias disponibles se

enfocan principalmente en el control sintomático, pero suelen representar una carga económica significativa para las familias que va incrementando anualmente (5). No obstante, los avances recientes en la investigación han permitido progresos prometedores, abriendo nuevas perspectivas para el desarrollo de tratamientos innovadores y personalizados, como por ejemplo, los medicamentos dirigidos (59).

## ***1.4.2 Contexto molecular***

### ***1.4.2.1 Rol de la matriz extracelular***

La matriz extracelular (MEC) es una red compleja de macromoléculas (compuesta por colágeno, enzimas y proteínas) que se encarga principalmente de brindar soporte estructural a los tejidos al recibir fuerzas externas, y además bioquímicamente regula los procesos celulares (60)(61). Hay dos relaciones entre las células y la matriz.

- **Células como constructoras de MEC:** Las células de los tejidos (como los fibroblastos en el tejido conectivo) son responsables de sintetizar y secretar los componentes de la MEC (60). Al hacerlo, no solo estructuran el entorno tisular, sino que también crean microambientes específicos que influyen en la organización, función y comportamiento de las células vecinas. Esto se logra mediante señales microarquitectónicas, biomecánicas y bioquímicas en la MEC, además de la secreción regulada de mediadores solubles como citocinas, factores de crecimiento y metabolitos (62).
- **Impacto de la MEC en la función celular:** La MEC está compuesta por una amplia variedad de macromoléculas que aportan diversidad estructural, bioquímica y funcional. Esta complejidad permite que la MEC se adapte para cumplir su función en el tejido, regulando procesos celulares clave, como el crecimiento, la diferenciación, la migración, la homeostasis, la supervivencia de las células en el tejido y la morfogénesis (63).

Además, la MEC constituye más del 90% del cartílago articular, mientras que los condrocitos representan menos del 5%. El resto de los componentes se encuentran en menor proporción (64). Entre los componentes más importantes que permiten la estructura y función de la MEC del cartílago articular se encuentran el colágeno tipo II y el proteoglicano sulfatado, agregano (65). El colágeno tipo II forma una red fibrilar que proporciona resistencia mecánica y soporte estructural, mientras que el agregano, al retener grandes cantidades de agua gracias a sus cadenas de glucosaminoglucanos (GAGs), permite que el cartílago soporte cargas de compresión y mantenga

su elasticidad. En la OA la MEC se degrada dentro de las articulaciones sinoviales debido a un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de sus componentes en la cavidad articular (66). La destrucción del colágeno tipo II y el agrecano se considera un proceso patológico central, ya que compromete la integridad estructural y funcional del cartílago, contribuyendo al deterioro progresivo de la articulación (65).

#### *1.4.2.2 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)*

Se sabe que la OA se caracteriza principalmente por la inflamación que se provoca en las articulaciones. En este entorno, células inmunitarias que producen mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y las interleucinas (IL-1 e IL-7) cumplen una acción regulatoria. Estos mediadores estimulan la producción de MMPs, enzimas que degradan componentes de la MEC, exacerbando la inflamación y favoreciendo el daño progresivo, sobre todo, del cartílago tipo II (66). Cabe destacar que las MMPs son las principales y más eficaces enzimas capaces de degradar al colágeno fibrilar, y su actividad está estrictamente regulada por inhibidores endógenos conocidos como inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), que desempeñan un papel esencial en mantener el equilibrio entre la síntesis y degradación de la MEC (61). Estas metaloproteinasas, dependientes de zinc para su actividad catalítica, junto con las ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs), median la degradación de proteínas clave de la matriz extracelular del cartílago, incluyendo colágeno y elastina (que son sus sustratos importantes). Esta acción conlleva a la pérdida de integridad del tejido cartilaginoso y contribuye al deterioro estructural característico de patologías articulares, en este caso, la OA (23)(67). Se reconoce también que los MMPs desempeñan un papel en la remodelación del tejido vascular en procesos biológicos como la angiogénesis, la embriogénesis, la morfogénesis y la reparación de heridas y que su alteración podría influir en la remodelación arterial y varios trastornos patológicos (68). Otro punto de relevancia a considerar, es que las MMPs son altamente homólogas y cada una con una organización multidominio que refiere varias regiones funcionales distintas. Todas poseen al centro catalítico dependiente del zinc (Zn<sup>2+</sup>), y este es esencial por su capacidad para degradar una amplia variedad de proteínas que se formaron en la MEC (como colágeno, elastina y proteoglicanos). Y además, estas enzimas comparten una estructura en común típica (aunque algunas contengan excepciones) como un propéptido N-terminal de unos 80 residuos que mantienen a la enzima en estado latente, un dominio catalítico central de aproximadamente 170 aminoácidos donde se localizan los iones Zn<sup>2+</sup>, una región de

bisagra o conectora que le ofrece flexibilidad estructural y un dominio C-terminal de tipo hemopexina; todo esto contribuye a la especificidad y a su localización celular de cada MMP. En este sentido la topología se conserva similar pero la diferencia radica en el subsitio de S1', que es un bolsillo hidrofóbico bien definido de profundidad variable que es importante en las interacciones (68).

- **MMP-13:** En modelos murinos de OA, se identificó a MMP-13 y Adamts5 como proteasas clave en la degradación de la matriz extracelular del cartílago. MMP-13, expresada y producida por los condrocitos que residen en el cartílago, participa principalmente en la descomposición del colágeno tipo II, que aporta resistencia y soporte estructural (66). Por su parte, Adamts5 es la principal enzima responsable de la degradación del agregano, proteoglicano que es fundamental para la capacidad del cartílago de resistir la compresión. Aunque MMP-13 también puede degradar el agregano, lo hace en menor medida. Entonces, la acción conjunta de ambas proteasas resulta crítica en el desarrollo y la progresión de la enfermedad (65). La capacidad de Mmp-13 para atacar tanto el colágeno como el agregano le otorga un doble papel en la destrucción de la matriz extracelular, contribuyendo significativamente al deterioro del cartílago (66). Estructuralmente, esta metalonoproteinasa tiene un sitio catalítico clave en el que un ion  $Zn^{2+}$  se encuentra coordinado por tres residuos de histidina conservados, formando parte esencial del mecanismo catalítico. La presencia de este ion metálico es indispensable, ya que sin él la enzima no puede llevar a cabo su función con precisión ni ejercer su actividad hidrolítica. El bolsillo S1' es la clave de la especificidad del sustrato, y en el caso de la MMP-13 este se encuentra en una zona intermediasmente profunda, lo que hace que se diferencie de otras MMPs Y es posible que sus inhibidores puedan conferir selectividad a únicamente esta proteína (69)(70).

### 1.5 Inflamación en la osteoartritis

Entre las principales rutas moleculares y factores inflamatorios involucrados, están:

### ***1.5.1 Inflamación de la membrana sinovial (sinovitis) y su impacto en la OA***

Como se mencionó, las lesiones articulares, como las causadas por la OA, desencadenan un proceso inflamatorio en la membrana sinovial, que recubre ciertas articulaciones. Esta inflamación no solo contribuye al dolor y la disfunción articular, sino que también puede actuar como un factor independiente en el inicio y la progresión estructural de la enfermedad. Además, en la OA, la permeabilidad de la membrana sinovial se ve alterada, lo que permite la entrada de mediadores inflamatorios y células inmunitarias, amplificando el proceso inflamatorio (71)(72).

Esta inflamación abarca una serie de anomalías histológicas y celulares que son perjudiciales. En primer lugar, el sinovio, en su estado normal, no contiene células inflamatorias, estas sólo aparecen en respuesta a un proceso inflamatorio (72). En este contexto, a medida que el cartílago se degrada, sus fragmentos microscópicos se liberan en el líquido sinovial, donde son detectados y fagocitados por las células sinoviales. Es así como estas células se activan e inducen la hiperplasia del revestimiento sinovial, caracterizada por un aumento en el número de células sinoviales, así como de células estromales, lo que contribuye a una mayor producción de mediadores proinflamatorios (73), por ende, se perpetúa un ciclo inflamatorio que agrava la degradación del cartílago. Y como resultado, la sinovitis. Por otro lado, los macrófagos, que se ubican en la capa de revestimiento del sinovio, desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis tisular (74). Sin embargo, cuando su regulación se altera, contribuyen al proceso inflamatorio. Como consecuencia, también se desencadena una respuesta inflamatoria exacerbada, con la liberación de las citocinas (como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y las quimiocinas, que estimulan la actividad de las MMPs y ADAMTS. Así sucesivamente, se liberan más fragmentos de cartílago al líquido sinovial, intensificando aún más la inflamación y promoviendo la destrucción articular.

Además, la inflamación sinovial favorece la infiltración de las células inmunitarias, incluidos los macrófagos y linfocitos T y B, activando una respuesta inmunitaria que perpetúa aún más la inflamación crónica en la articulación. Sin embargo, naturalmente para contrarrestar este proceso, tanto la membrana sinovial como el cartílago producen citocinas antiinflamatorias, aunque su efecto puede no ser suficiente para frenar la progresión de la enfermedad. Por otro lado, la membrana sinovial inflamada también influye en la formación de osteofitos mediante la activación de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), lo que contribuye también a la rigidez y al deterioro estructural de la articulación (72)(75)(76).

En segundo lugar, está la neoangiogénesis, un proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Se ha relacionado con el dolor articular (77). Durante la lesión del cartílago, múltiples vías de señalización regulan el proceso de reparación, siendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el principal mediador. Este factor promueve la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales y su expresión se ha detectado en el cartílago de pacientes con OA. La producción de VEGF aumenta en respuesta a la hipoxia, la inflamación y el daño tisular, favoreciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos y contribuyendo a la progresión de la enfermedad (78). Aunque la OA no se limita exclusivamente a la vía del VEGF, esta es una de las más estudiadas y relevantes. La respuesta inflamatoria en el cartílago es iniciada por citoquinas y quimiocinas producidas tanto por el propio cartílago como por tejidos circundantes, como el tejido adiposo y el sinovio. Después de la lesión, factores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 se encuentran regulados al alza en el entorno local, promoviendo la neoangiogénesis de manera directa o indirecta. Además, células inmunitarias como macrófagos y neutrófilos se infiltran en el sitio lesionado durante las primeras etapas de la inflamación, secretando VEGF y MMPs, facilitando así la formación de nuevos vasos sanguíneos (78). Este proceso no solo perpetúa la inflamación, sino que también contribuye al deterioro progresivo de la articulación. Reforzando así, la interacción entre inflamación y neoangiogénesis en la OA.

En tercer lugar, la fibrosis sinovial y la regeneración de fibrocartílago son procesos clave involucrados en la fibrosis en la OA (79). Tras una lesión en el tejido sinovial, se activa una respuesta de cicatrización y reparación tisular que puede evolucionar hacia fibrosis sinovial, como resultado de un desequilibrio entre la síntesis y degradación de la MEC (80). Esta acumulación excesiva de MEC, como componente clave del tejido conectivo, contribuye a la rigidez articular, especialmente en contextos de inflamación crónica o daño tisular (81). Simultáneamente, el daño al cartílago articular estimula la formación de fibrocartílago como un intento de reparación dentro de un microambiente inflamatorio. Sin embargo, este tejido posee propiedades mecánicas inferiores al cartílago hialino original. En este proceso, la inflamación crónica puede degradar la matriz cartilaginosa. Induce una diferenciación anómala de las células madre mesenquimales (MSC) y promueve la desdiferenciación de condrocitos hacia un fenotipo similar al de los fibroblastos, lo que favorece la producción de fibrocartílago en lugar de cartílago funcional (82). A diferencia de la fibrosis sinovial, que se caracteriza por una acumulación excesiva de matriz

extracelular en la membrana sinovial, el fibrocartílago surge dentro del cartílago articular como una respuesta adaptativa al daño. Mientras que la fibrosis sinovial contribuye a la rigidez y pérdida de movilidad articular, el fibrocartílago intenta restaurar la estructura del cartílago, aunque con menor capacidad de carga y resistencia mecánica. A pesar de estas diferencias, la mayoría de los estudios han concluido que la presencia de sinovitis en la OA está asociada con un dolor más severo y una disfunción articular (76). No solo el cartílago se ve afectado, sino también el hueso subcondral, los ligamentos y el sinovio, todos involucrados en un entorno inflamatorio. Y como se mencionó, como consecuencia la inflamación crónica de la membrana sinovial contribuye al dolor, la degradación del cartílago y la remodelación ósea. Los mediadores inflamatorios activan MMPs, promoviendo la destrucción del cartílago, mientras que la neoangiogénesis y la fibrosis alteran la función sinovial y aceleran la progresión de la enfermedad. Además, se cree que la fibrosis también forma parte de este proceso (79).

## ***1.5.2 Citoquinas y mediadores inflamatorios involucrados***

### ***1.5.2.1 Citoquinas proinflamatorias***

Las citoquinas desempeñan un papel clave en el equilibrio entre la degradación y regeneración de los tejidos (83). Como consecuencia, la degradación del cartílago genera fragmentos o péptidos derivados de la MEC, los cuales pueden activar a diversas células dentro de la articulación, como condrocitos, células óseas y sinoviales, promoviendo la liberación de citoquinas proinflamatorias. Además, estas citoquinas no solo son liberadas por las células articulares, sino también por células inflamatorias, como macrófagos y linfocitos (59). Por lo tanto, también pueden promover su propia producción (83). Las citocinas proinflamatorias elevadas desempeñan un papel causal clave en la alteración de la homeostasis del cartílago en la articulación (84). Estas no solo favorecen la infiltración celular, sino que también potencian la degradación del cartílago mediante la inducción de enzimas degradadoras de la matriz extracelular (76). En los tejidos afectados por OA, se ha detectado un aumento de diversas citocinas proinflamatorias, como la interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y el factor inhibidor de la leucemia (LIF). Entre ellas, IL-1 $\beta$  y (TNF)- $\alpha$  desempeñan un papel central en la progresión de la enfermedad, ya que estimulan la producción excesiva de metaloproteinasas de matriz (MMP), y como se sabe, se acelera la degradación del cartílago (22)(44)(85)

### 1.5.2.2 Quimiocinas

Las quimiocinas son una subfamilia de citocinas de bajo peso molecular que, según la posición de sus residuos de cisteína (C), se clasifican en cuatro familias: CXC, CC, C y CX3C. La quimiocina más estudiada en la OA es el ligando 2 del CC (CCL2), también conocido como MCP-1 (proteína atrayente de monocitos 1) (59). Además de CCL2, otros miembros de la familia CC, como CCL5, han sido implicados en la OA. No obstante, la evidencia sugiere que el eje CCL2/CCR2 tiene un papel predominante en el reclutamiento de macrófagos y en la progresión del daño articular. También se estudió que la deficiencia de CCL2 regula a la baja las respuestas inflamatorias locales en un modelo experimental de OA en ratón mientras que la ausencia de CCR5 o CCL5 no mostró efectos significativos en la progresión de la enfermedad ni en la acumulación de macrófagos en las articulaciones de la rodilla afectadas por OA (86). Al igual que ocurre con otras citoquinas proinflamatorias, la estimulación de condrocitos con CCL2 no solo reduce la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, sino que también aumenta la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMPs), lo que contribuye a la degradación del cartílago (59).

### 1.5.2.3 Mediadores antiinflamatorios

Otro grupo, son las citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13) que desempeñan un papel clave en la regulación de la inflamación y la protección del cartílago en la OA. La IL-4 ejerce un fuerte efecto condroprotector, ya que inhibe la degradación de proteoglicanos en el cartílago al reducir la secreción de MMPs y disminuye la producción de citoquinas inflamatorias. De manera similar, la IL-10 también protege el cartílago al inhibir la producción de MMPs y prevenir la apoptosis de los condrocitos. Por otro lado, la IL-13 parece tener un efecto protector más enfocado en los fibroblastos sinoviales, reduciendo la inflamación y promoviendo la síntesis de IL-1Ra (antagonista de IL-1 $\beta$ ). Sin embargo, el efecto de las citoquinas antiinflamatorias no es preventivo, sino que funciona como una respuesta secundaria a la inflamación existente. Su acción se observa principalmente en células ya estimuladas por citoquinas proinflamatorias, mientras que en células no inflamadas no se detectan cambios significativos. Este mecanismo de “acción-reacción” sugiere que el impacto anticatabólico de estas citoquinas siempre estará condicionado a la presencia de mediadores inflamatorios. Aunque muchos estudios respaldan su potencial terapéutico, las citoquinas antiinflamatorias por sí solas no logran detener completamente la progresión de la OA, ya que no bloquean por completo las vías catabólicas (83).

### ***1.5.3 Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en la inflamación***

La disfunción mitocondrial puede contribuir al desgaste articular al afectar distintas vías celulares. Además de la generación de energía, las mitocondrias participan en diversos procesos celulares, incluyendo la apoptosis, la señalización de calcio y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (87). Entre ellas, altera la señalización por falta de oxígeno en las células del revestimiento sinovial, deteriora la capacidad de los condrocitos para fabricar componentes del cartílago y afecta su crecimiento. Investigaciones recientes han demostrado que la disfunción mitocondrial y la alteración en la producción de energía desempeñan un papel clave en la OA. Los condrocitos de pacientes con esta enfermedad presentan menor actividad mitocondrial, menor producción de ATP y más radicales libres (ROS), lo que genera estrés oxidativo, muerte celular y mayor desgaste del cartílago (88). Además, la ROS y la inflamación están estrechamente relacionadas, ya que un exceso de radicales libres activa proteasas degradadoras de la matriz extracelular, promoviendo la destrucción del cartílago y la disfunción articular. En la OA, el estrés oxidativo surge cuando hay un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlas, lo que contribuye a un estado de inflamación crónica (89).

### ***1.5.4 Interacción entre inflamación y degradación del cartílago***

Como se mencionó anteriormente, el cartílago es un tejido metabólicamente activo que experimenta una remodelación continua, un proceso controlado por los condrocitos que son su principal componente celular (90). Y cuando la OA inicia, lo hace por factores mecánicos adversos, como estrés mecánico excesivo o lesiones articulares, que provocan daño en los condrocitos. Estas células, al ser afectadas, liberan mediadores inflamatorios y activan diversas vías de señalización que contribuyen a la inflamación local. A medida que el cartílago se degrada, se liberan alarminas intracelulares (como S100A8/9 y HMGB1) y fragmentos de la MEC, los cuales amplifican la inflamación tanto en el cartílago como en otras estructuras articulares. Estos fragmentos son reconocidos por receptores del sistema inmunológico innato y desencadenan una respuesta inflamatoria que incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas por parte de los condrocitos. El entorno inflamatorio establece un ciclo de retroalimentación, donde la inflamación potencia la degradación del cartílago, y la liberación de fragmentos de ECM intensifica aún más la inflamación (74).

### ***1.5.5 Interacción entre inflamación y hueso subcondrial***

La región subcondrial incluye la marca de marea, la capa de cartílago calcificado y la placa ósea subcondrial. La estrecha conexión física entre el cartílago y el hueso sugiere que existe una interacción bioquímica y molecular a través de su interfaz, tanto en articulaciones sanas como en las afectadas por OA, aunque los mecanismos involucrados aún no se comprenden completamente (91). Lejos de actuar como una barrera impermeable, la unión hueso-cartílago presenta canales vasculares, fisuras y microfisuras que permiten el intercambio de mediadores moleculares entre ambos tejidos, afectando la homeostasis articular. En este entorno, se ha demostrado que esta renovación ósea (remodelación) juega un papel fundamental en la patogénesis de la OA, pues la enfermedad se asocia con una pérdida ósea temprana derivada del aumento de la remodelación ósea acelerada, que posteriormente evoluciona hacia una densificación de la placa subcondrial y a la consiguiente pérdida del cartílago (92). Cabe destacar, nuevamente que la OA no es un proceso aislado, sino una enfermedad compleja en la que diversos mecanismos están interconectados.

### ***1.5.6 Otros factores que desencadenan la OA***

En la OA, la pérdida progresiva de condrocitos está estrechamente ligada al desgaste del cartílago, lo que induce cambios en su comportamiento celular. Como respuesta, los condrocitos activan fenotipos hipertrófico y catabólico, caracterizados por un aumento en la expresión de enzimas degradativas y marcadores de osificación, lo que acelera la degradación de la matriz extracelular y contribuye al avance de la enfermedad (23). Entonces, la OA se reconoce cada vez más como una enfermedad que afecta a toda la articulación, donde el cartílago, el sinovio, el hueso subcondrial y los músculos asociados presentan alteraciones patológicas durante su desarrollo y progresión. La sinovitis crónica, caracterizada por la inflamación persistente de la membrana sinovial, emerge como una patología central vinculada estrechamente con la degeneración del cartílago y el estrés oxidativo, factores clave en la enfermedad (22).

## **1.6 Diagnóstico de la Osteoartritis**

El diagnóstico de la OA se basa en una combinación de criterios clínicos, estudios de imagen y biomarcadores.

### ***1.6.1 Evaluación del dolor***

El dolor causado por la OA es complejo hasta la actualidad y varía entre individuos. Actualmente, su evaluación depende de observaciones subjetivas y signos clínicos observables, lo que dificulta su manejo (93). Mientras que algunas personas experimentan un aumento progresivo del dolor, otras permanecen estables por años, y curiosamente, esta variación no siempre está relacionada con la progresión de la enfermedad. Durante la OA, los nociceptores se vuelven más sensibles (sensibilización periférica), lo que provoca que estímulos leves generen dolor y limita la movilidad, también conocido como dolor nociceptivo, que es común en casos de OA. Con el tiempo, la estimulación constante puede derivar en dolor neuropático. Es así como, la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) introdujo el término "dolor nociplásico", que es un tipo de dolor que surge debido a una sensibilización en el sistema nervioso, sin que haya un daño evidente en los tejidos o en los nervios (93)(94)(95)(96).

### ***1.6.2 Técnicas de Imagen***

Las imágenes siguen desempeñando un papel importante en la evaluación de la OA (97). El diagnóstico y seguimiento de la OA ha avanzado con nuevas tecnologías de imagen, incluyendo resonancia magnética (RM) mejorada, tomografía computarizada (TC) de soporte de peso, PET-MRI (Tomografía por Emisión de Positrones - Resonancia Magnética), ultrasonido con contraste y técnicas fotoacústicas. Además, la inteligencia artificial también se ha integrado en el análisis de imágenes médicas (98). Aunque, la radiografía sigue siendo la técnica inicial más utilizada, su baja sensibilidad limita la detección temprana. En cambio, la RM permite visualizar la morfología y composición del cartílago, siendo clave en la investigación y en la evaluación de la progresión de la enfermedad. Y el ultrasonido es útil para detectar sinovitis, osteofitos y extrusión meniscal, aunque su papel en la OA temprana aún está en estudio (99). La elección de la técnica depende del objetivo clínico: radiografía para diagnóstico inicial, RM para seguimiento estructural y ultrasonido para inflamación articular.

### **1.6.3 Biomarcadores**

Los biomarcadores, o marcadores moleculares, son mediciones biológicas que permiten evaluar los efectos de una intervención en vías moleculares y celulares, además de predecir la efectividad de un tratamiento (100). Pueden ser moléculas específicas, como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, o manifestarse a través de cambios fisiológicos, como alteraciones en la expresión genética, la estructura celular o el metabolismo (101). En la OA, su aplicación es clave para la detección y diferenciación temprana de la enfermedad, aunque su desarrollo y validación aún son limitados (102). Entonces, un biomarcador en este contexto puede actuar como una molécula efectora que contribuye al daño articular, un producto resultante de dicho daño, o ambas cosas (103).

## **1.7 Flavonoides como Agentes Terapéuticos**

### **1.7.1 Introducción a los flavonoides**

Los flavonoides son compuestos polifenólicos naturales ampliamente distribuidos en frutas, verduras y otros productos de origen vegetal. Su estructura básica, compuesta por un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, les confiere una doble funcionalidad: por un lado, actúan como potentes antioxidantes, neutralizando radicales libres y protegiendo contra el daño oxidativo; por otro, desempeñan un papel clave en la señalización celular. Estos compuestos pueden interactuar con receptores celulares y proteínas clave, como quinasas y enzimas, modulando cascadas de señalización que regulan diversas respuestas fisiológicas y la expresión génica (104). En este contexto, los flavonoides están distribuidos de manera desigual en la naturaleza, con ciertos alimentos como fuentes principales, y su estructura polifenólica los hace sensibles a enzimas oxidativas y a la cocción (105). Además, se ha demostrado que los flavonoides poseen propiedades antioxidantes en sistemas *in vitro*, además de efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores, antivirales, antialérgicos y anticancerígenos, donde su actividad antioxidante y antiinflamatoria contribuye a mitigar el estrés inducido por toxinas y a prevenir enfermedades crónicas (106)(107)(108). Es por ello que, en esta revisión, se abordará el potencial terapéutico de algunos flavonoides en la OA, haciendo énfasis en su papel en la regulación de la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMPs), particularmente la MMP-13, cuya sobreexpresión está asociada a enfermedades inflamatorias y degenerativas. Entonces, se examinarán las propiedades farmacológicas de estos

distintos flavonoides, su biodisponibilidad y sus mecanismos de acción mediante estudios de acoplamiento molecular (docking), con el objetivo de identificar aquellos con mayor potencial para su aplicación en terapias dirigidas.

### ***1.7.2 Clasificación y propiedades generales***

Los flavonoides tienen actividad antioxidante, pero esta depende de su estructura (109). Son compuestos con efectos pleiotrópicos, lo que significa que pueden influir en diversos procesos biológicos a través de mecanismos distintos (110). Desde el punto de vista estructural, los flavonoides naturales se pueden clasificar en distintos subgrupos, tales como flavonoles, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonas. Además, estos compuestos tienen el potencial de inhibir las respuestas inflamatorias mediadas por la vía de señalización NF- $\kappa$ B, el cual regula los procesos inflamatorios e inmunológicos, así como de prevenir la degradación de la matriz extracelular y la apoptosis de los condrocitos (111)(112)(113).

### ***1.7.3 Flavonoides naturales estudiados***

Ciertos flavonoides han sido objeto de estudio por su potencial para inhibir la actividad de MMP-13. Mediante docking molecular, se busca identificar interacciones clave entre estos compuestos y la enzima, con el objetivo de evaluar su posible aplicación en estrategias terapéuticas para la OA.

#### ***1.7.3.1 Rutina***

La rutina es un flavonol perteneciente a los rutinosidos, derivado de la quercetina, en el que un grupo hidroxilo en la posición C-3 está sustituido por glucosa y ramnosa (114). Es abundante en diversas fuentes vegetales, como cítricos, trigo sarraceno, manzanas y té verde, lo que la hace un compuesto relevante en la dieta (115)(116). Además, la rutina (con fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>), posee múltiples actividades biológicas, incluyendo propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti alergénicas, antimicrobianas, antivirales y citoprotectoras (117). Por ende, sus estudios se centran en sus propiedades antioxidantes y su capacidad para modular diversas vías de señalización celular, lo que la ha posicionado como un compuesto de interés en la investigación de enfermedades inflamatorias y degenerativas (118)(119)(120).

### 1.7.3.2 Nicotiflorina

La nicotiflorina, o kaempferol-3-rutinósido, es un flavonoide glucosilado (con fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{15}$ ), presente en plantas (121). Tiene la estructura química básica de los flavonoides que son dos anillos aromáticos unidos por un anillo heterocíclico de oxígeno. Se ha estudiado por sus propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras, antiinflamatorias, antiparasitarias y de neuroprotección, lo que la hace relevante en la investigación de diversas enfermedades (122)(123).

### 1.7.3.3 Orientina

La orientina ( $C_{21}H_{20}O_{11}$ ) es un flavonoide C-glucosilado derivado de la luteolina, caracterizado por su solubilidad en agua y su presencia en diversas plantas que son medicinales, como las hojas de bambú y la albahaca sagrada (124)(125)(126). Destaca por su potente actividad antioxidante y antiinflamatoria, además de ejercer una influencia prominente en la inhibición de la apoptosis y la neuroprotección, lo que le confiere propiedades cardioprotectoras, vasodilatadoras y terapéuticas en enfermedades inflamatorias (127)(128). Además, su capacidad para inhibir el estrés oxidativo y modular respuestas inflamatorias la convierte en un compuesto de interés. Agregado a esto, en modelos de osteoartritis en ratones, se ha observado que la orientina puede atenuar la respuesta inflamatoria (126).

### 1.7.3.4 Vitexina

La vitexina ( $C_{21}H_{20}O_{10}$ ) es un glucósido de flavona de apigenina, que está presente en diversas fuentes vegetales como la passiflora, vitex, el bambú y el mijo perla (129)(130). Se ha caracterizado por su potente actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica, además de sus efectos neuroprotectores, antitumorales y cardioprotectores (131)(132)(133). Puede eliminar eficazmente los radicales reactivos, aumentar los niveles de antioxidantes endógenos y reducir las reacciones peroxidativas; además, esta contribuye a preservar la actividad de la catalasa en las mitocondrias, posiblemente a través de la vía mediada por el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) (134). Su capacidad para donar electrones y eliminar radicales libres la posiciona como un compuesto de interés en la investigación de enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (132).

### 1.7.3.5 Apigetrina

La apigetrina también es conocida como apigenina-7-O- $\beta$ -D-glucósido (con fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_{10}$ ), es un flavonoide natural ampliamente distribuido en frutas, verduras y hierbas, conocido por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antifúngica, antimutagénica y

anticancerígena (135)(136). Está presente en hojas, semillas, verduras, frutas y diversas plantas medicinales, como *Teucrium Gnaphalodes*, *Stachys Tibetica Vatke* y *Scutellaria Baicalensis Georgi* (136). Estudios han demostrado que puede inhibir la activación de ciertas vías de señalización celular, como JNK, involucradas en la inflamación inducida por TNF- $\alpha$  (112).

#### **1.7.4 Inhibidor selectivo sintético**

Los inhibidores sintéticos han despertado un considerable interés debido a su capacidad para modular de manera eficaz la actividad excesiva o desregulada de las MMPs. Estos compuestos destacan por su rápido y eficiente bloqueo de enzimas clave, lo que les confiere un alto potencial terapéutico. Además, presentan ventajas importantes, como una mayor selectividad hacia subtipos específicos de MMPs, mejor biodisponibilidad y una menor toxicidad en comparación con otras estrategias terapéuticas (137).

##### **1.7.4.1 Inhibidor CL-82198**

Este inhibidor, desarrollado como un tratamiento farmacológico para prevenir la progresión de la OA, presenta una alta selectividad hacia la MMP-13 y ha demostrado eficacia en modelos animales, donde logró mitigar la destrucción del cartílago y reducir el daño articular. Sin embargo, su aplicación aún enfrenta limitaciones, como la necesidad de una administración frecuente en modelos preclínicos (138)(88)(139).

### **1.8 Química Cuántica Aplicada al Estudio Molecular**

La química cuántica proporciona el marco teórico fundamental para describir el comportamiento de los electrones en sistemas moleculares. A través de métodos como la teoría del funcional de densidad (DFT) y la aproximación de orbitales moleculares, es posible analizar la estabilidad electrónica, la reactividad química y las interacciones intermoleculares. Estas herramientas son esenciales en el estudio computacional de moléculas y complejos biomoleculares, permitiendo predecir propiedades estructurales y energéticas con alta precisión. En términos generales, la química cuántica (QC) aplica los principios de la mecánica cuántica para analizar las características químicas y físicas de átomos, moléculas y materiales (140). Su uso en la simulación computacional facilita la comprensión de interacciones a nivel electrónico.

## 1.9 Mecánica Molecular y Simulación Computacional

La mecánica molecular (MM) y la simulación computacional constituyen metodologías esenciales para el estudio de sistemas biomoleculares, permitiendo modelar y predecir la estructura, estabilidad y dinámica de moléculas complejas. Mediante el uso de campos de fuerza y métodos de simulación, se sabe que es posible evaluar las interacciones proteína-ligando y explorar su relevancia en procesos biológicos y farmacológicos. Para abordar estos conceptos, se han considerado fuentes que son especializadas como “Computational Chemistry and Molecular Modeling” de Ramachandran et al. (2008) (141), “Computer Aided Drug Design (CADD): From Ligand-Based Methods to Structure-Based Approaches” de M. Rudrapal y C. Egbuna (2022) (142) y el volumen 4 del libro “Comprehensive Medicinal Chemistry II” de John B. Taylor y David J. Triggle (2007) (143).

### 1.9.1 Modelos Moleculares y Simulaciones

La química computacional permite el estudio de sistemas moleculares mediante modelos teóricos y simulaciones, permitiendo estudiar la estructura, interacción y dinámica de las moléculas a nivel atómico. Dentro de este campo, se emplean diversos enfoques que varían en complejidad y precisión, desde modelos mecánicos clásicos hasta cálculos cuánticos avanzados. Uno de los métodos más utilizados es la MM, que trata a los átomos como esferas conectadas por enlaces semejantes a resortes, permitiendo la optimización geométrica de moléculas grandes en tiempos computacionales reducidos y así simular sistemas biológicos complejos debido a su rapidez y eficiencia. Este enfoque es la base del docking molecular, ya que permite evaluar la conformación y afinidad de ligandos con receptores biológicos. Además, la simulación mediante dinámica molecular (DM) permite modelar la evolución temporal de sistemas moleculares, facilitando la comprensión de procesos como el reconocimiento molecular y la estabilidad de complejos macromoleculares (en la Tabla 1.1 se visualiza de manera clara que técnica es la más adecuada para el tipo de sistema molecular (144)).

**Tabla 1.1**

Métodos computacionales según el tipo de molécula o sistema estudiado.

TIPO DE MOLÉCULA O SISTEMA	TÉCNICAS RECOMENDADAS
Ligandos pequeños	DFT / Semiempírico
Interacción proteína-ligando	MM / Docking molecular
Optimización conformacional	MM / DFT
Estudios de estabilidad enzimática	Semiempírico / ab initio
Complejos proteína-ligando en solvencia	MD (Molecular Dynamics)

Fuente: Adaptado de Leach AR. Molecular modelling: principles and applications. 2nd ed. Harlow: Pearson Education; 2001(144).

Además, como la DM permite estudiar la evolución temporal de sistemas biológicos aplicando las Leyes de Newton, las ecuaciones de movimiento se expresan de la siguiente manera:

$$F = \frac{dP}{dt} = m \frac{d^2r}{dt^2} \quad (1)$$

Estas ecuaciones clásicas de movimiento se resuelven mediante el método de diferencias finitas, así generar las trayectorias de MD.

### 1.9.2 Evaluación Energética y Conformacional de Ligandos

El estudio de interacciones moleculares es crucial para comprender y predecir el comportamiento de los ligandos en sistemas biológicos. La evaluación energética y conformacional permite caracterizar tanto la estabilidad estructural como la accesibilidad a los sitios de unión, facilitando el diseño y optimización de moléculas con actividad biológica. Es así como la MM proporciona una metodología rápida y eficiente para la optimización de geometrías moleculares mediante la modelización de átomos como esferas conectadas por enlaces elásticos, similares a resortes. A partir de parámetros predefinidos, como longitudes de enlace y ángulos de torsión, es posible

minimizar la energía de una estructura molecular, permitiendo la predicción de conformaciones estables y la evaluación de la flexibilidad estructural de un ligando. En el contexto de la simulación de la DM, se pueden analizar variaciones estructurales de los ligandos a lo largo del tiempo en condiciones fisiológicas. De todas maneras hay que recalcar que la combinación de estos enfoques computacionales con datos experimentales permite un análisis más preciso de la estabilidad conformacional, la accesibilidad a sitios de unión y las propiedades energéticas de los ligandos.

### 1.10 Campos de Fuerza y Simulación Molecular

Para describir la energía de un sistema molecular, es necesario definir un campo de fuerza, el cual es un conjunto empírico de funciones matemáticas que modelan la energía potencial en función de sus coordenadas atómicas, describen la interacción entre átomos y permiten estimar la estabilidad estructural de un sistema. En este contexto, la energía potencial total de un sistema molecular en un campo de fuerza se expresa como:

$$E_{Total} = E_{Estiramiento} + E_{Flexión} + E_{Torsión} + E_{Electrostática} + E_{Van\ der\ Waals} + E_{Puente\ de\ hidrógeno} \quad (2)$$

Donde:

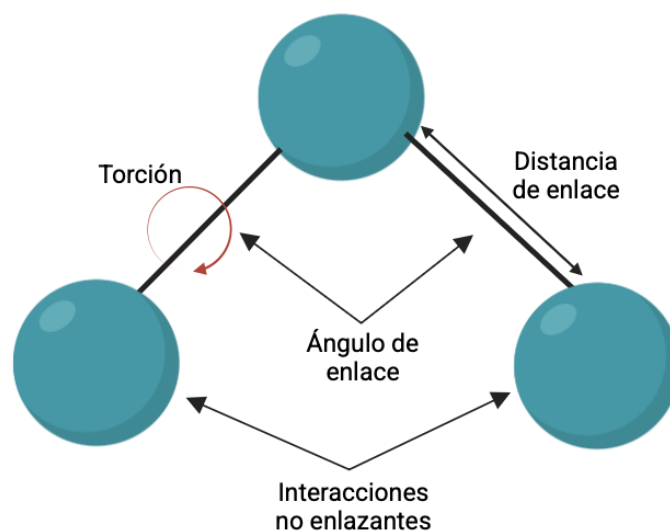
- $E_{Estiramiento}$ : es la energía de estiramiento de los enlaces.
- $E_{Flexión}$ : es la energía de flexión de ángulos de enlace.
- $E_{Torsión}$ : representa la energía torsional.
- $E_{Electrostática}$ : es la interacción entre cargas parciales.
- $E_{Van\ der\ Waals}$ : considera interacciones de dispersión y repulsión.
- $E_{Puente\ de\ hidrógeno}$ : modela los enlaces de hidrógeno

Para analizar la estabilidad conformacional y energética de los ligandos, es fundamental minimizar la energía del sistema. Este proceso permite encontrar estructuras de menor energía optimizando

su geometría y eliminando tensiones estéricas. Es así como, la minimización de energía se basa en la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton con el campo de fuerza seleccionado ( $T=0$ ). Para ello, se establece un número determinado de pasos de equilibración y, posteriormente, se aumenta la temperatura del sistema reescalando las velocidades hasta alcanzar un estado estable, en el que sus propiedades ya no varíen significativamente con el tiempo. En la Figura 1.4 se ilustran las contribuciones a la energía potencial de un sistema molecular, incluyendo la distancia de enlace, ángulo de enlace, torsión y las interacciones no enlazantes.

**Figura 1.4**

Interacciones enlazantes y no enlazantes en un campo de fuerzas de Mecánica Molecular.



Fuente: Elaboración propia con BioRender.com

Para obtener información dinámica sobre los ligandos en su entorno, se recurre a la simulación molecular, que es un método computacional que permite analizar el comportamiento de sistemas moleculares a través de modelos matemáticos. Dependiendo del nivel de precisión requerido, se pueden emplear distintas técnicas de simulación, cada una con enfoques específicos.

### *1.10.1 Principales Campos de Fuerza*

Los campos de fuerza desempeñan un papel fundamental en la simulación de la MD de ligandos, especialmente en el descubrimiento de fármacos, ya que garantizan la precisión en la representación de pequeñas moléculas orgánicas. Para ello, estos modelos han sido continuamente actualizados y también optimizados, incorporando nuevos parámetros que abarcan una mayor diversidad de entidades químicas (145). Los principales son:

#### *1.10.1.1 AMBER*

El campo de fuerza AMBER fue desarrollado para modelar biomoléculas, enfocándose inicialmente en proteínas y ácidos nucleicos, aunque con el tiempo se ha ampliado para incluir ciertos compuestos orgánicos y polímeros. Destaca por su precisión en la descripción de geometrías moleculares en fase gaseosa, energías de solvatación, frecuencias vibracionales y energías conformacionales. Además, este emplea una representación United Atom (UA), en la que los hidrógenos no polares se combinan con los átomos pesados a los que están enlazados, reduciendo la complejidad y el costo computacional. No obstante, esta aproximación puede comprometer la precisión en ciertos sistemas, especialmente en la predicción de algunas propiedades estructurales y energéticas (146).

#### *1.10.1.2 CHARMM*

El campo de fuerza CHARMM, gracias a su flexibilidad, puede utilizarse en la simulación de diversos sistemas, que van desde moléculas pequeñas hasta las macromoléculas biológicas en medios acuosos. Sobresale, entonces, en el análisis de interacciones y energía conformacional, así como en la determinación de geometrías, estados de mínima energía, dinámica temporal, barreras rotacionales, frecuencias vibracionales y energía libre. Asimismo, incorpora una función de energía integral y adaptable, lo que lo convierte en una herramienta eficaz para múltiples aplicaciones en simulación (147).

#### *1.10.1.3 OPLS*

OPLS es uno de los campos de fuerza utilizados en MOFs (estructuras metal-orgánicas) para la captura de carbono, y suele combinarse con métodos como QM/MM para mejorar la precisión en las interacciones electrostáticas y efectos de polarización. En particular, OPLS-AA es un modelo detallado y preciso, con la flexibilidad de adaptarse mediante parametrización adicional. Al ser un campo de fuerza All-Atom, representa explícitamente todos los átomos de la molécula, lo que

proporciona una descripción más precisa de las interacciones moleculares en comparación con los modelos United Atom, aunque algunos grupos funcionales pueden requerir ajustes específicos para su correcta simulación (148).

#### *1.10.1.4 GROMOS*

GROMOS es un campo de fuerza integrado en el paquete de simulación molecular GROMOS (Groningen Molecular Simulation package), diseñado para estudiar sistemas biomoleculares a través de dinámica molecular. Su desarrollo ha estado enfocado en la simulación de proteínas, nucleótidos y azúcares en soluciones acuosas o apolares. Aunque es ampliamente utilizado en estos entornos, su aplicación en fase gaseosa presenta ciertas limitaciones (149).

#### *1.10.2 Parámetros y Contribuciones Energéticas*

En esta sección se describen los parámetros empleados en el campo de fuerza, incluyendo términos para la energía de enlaces, ángulos, torsiones e interacciones no covalentes como electrostática y van der Waals.

##### *1.10.2.1 Energía de Enlaces, Ángulos y Torsión*

En la DM, la energía de enlace es un componente clave de la función de energía potencial, que gobierna el movimiento de los átomos en la simulación. La energía de enlace varía según el tipo de interacción química, influyendo en la resistencia estructural de los materiales y biomoléculas. Los enlaces más débiles, como las interacciones de Van der Waals ( $\sim 0.0654$  kcal/mol), contrastan con los enlaces covalentes simples C-C ( $\sim 83$  kcal/mol), dobles C=C ( $\sim 146$  kcal/mol) y triples C $\equiv$ C ( $\sim 195$  kcal/mol). Además, los enlaces de hidrógeno (2-10 kcal/mol) y los enlaces disulfuro ( $\sim 51$  kcal/mol) juegan un papel clave en la estabilidad de proteínas y otras macromoléculas (150). En dinámica molecular, los ángulos y la torsión desempeñan un papel fundamental en la estabilidad y conformación de las moléculas. La energía angular se encarga de mantener la geometría molecular, mientras que la energía torsional regula las rotaciones alrededor de los enlaces simples, determinando así las conformaciones preferidas de una molécula. El modelado de estas interacciones se basa en ecuaciones específicas dentro de los campos de fuerza. La energía de ángulo de enlace se describe mediante una expresión:

$$E_{\text{ángulo}} = \frac{1}{2} k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \quad (3)$$

Donde:

- $E_{\text{ángulo}}$  : Energía potencial debido a la deformación angular.
- $k_{\theta}$  : Constante de fuerza del ángulo (determina la rigidez del ángulo).
- $\theta$  : Ángulo actual entre los tres átomos considerados.
- $\theta_0$  : Ángulo de referencia o de equilibrio en el campo de fuerza.

Por otro lado, la energía torsional se representa mediante una serie de cosenos, lo que permite describir los mínimos y máximos energéticos de las rotaciones moleculares:

$$E_{\text{torsión}} = \sum_{n=0}^N V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \quad (4)$$

Donde:

- $E_{\text{torsión}}$  : Energía potencial torsional.
- $V_n$  : Parámetro de barrera torsional (determina la magnitud de la barrera de energía).
- $\omega$  : Ángulo de torsión, definido por cuatro átomos en secuencia (1-2-3-4).
- $n$  : Multiplicidad, que indica el número de mínimos energéticos en una rotación de  $360^\circ$ .
- $\gamma$  : Factor de fase, que ajusta la posición de los mínimos de energía en la curva torsional.

En los campos de fuerza utilizados en dinámica molecular, es esencial que los perfiles energéticos torsionales sean correctamente parametrizados para obtener simulaciones precisas.

#### 1.10.2.2 Interacciones de van der Waals y Electroestática

Las fuerzas no enlazadas son clave porque determinan cómo interactúan y se organizan los átomos y moléculas en distintos sistemas, afectando propiedades como la estabilidad estructural, la solubilidad y el reconocimiento molecular. A diferencia de los enlaces químicos, estas fuerzas actúan sin necesidad de una conexión directa entre los átomos. Se dividen en dos tipos principales:

las interacciones electrostáticas y las fuerzas de van der Waals, que dependen de la distancia entre las partículas (151).

### **1.11 Interacciones Proteína-Ligando en Docking Molecular**

El estudio de las interacciones proteína–ligando mediante herramientas computacionales ha permitido comprender con mayor precisión la estabilidad estructural, la afinidad de unión y la selectividad de compuestos bioactivos hacia sus blancos moleculares. En particular, el acoplamiento molecular (docking) permite predecir la orientación más favorable de una molécula pequeña dentro del sitio activo de una proteína, estimando la energía de interacción entre ambos. Estos cálculos se complementan con simulaciones de dinámica molecular, las cuales utilizan campos de fuerza de MM para describir las interacciones intra e intermoleculares entre el ligando, la proteína y el solvente. Así, estas técnicas permiten racionalizar el diseño y selección de candidatos terapéuticos con mayor afinidad y especificidad hacia la proteína diana (152).

### **1.12 La bioinformática en biotecnología**

La bioinformática es una disciplina interdisciplinaria que emplea métodos computacionales para predecir la estructura, función y sitios activos de proteínas, facilitando la interpretación y el complemento de datos experimentales. Estos enfoques permiten identificar regiones funcionales asociadas tanto a la actividad biológica como catalítica de una molécula, siendo especialmente útiles cuando se integran con técnicas experimentales en estudios con fines biomédicos o biotecnológicos (153). En el contexto de la búsqueda de compuestos bioactivos, los productos naturales continúan siendo una fuente relevante de innovación en biotecnología. No obstante, la alta tasa de redescubrimiento de moléculas ya conocidas ha motivado un cambio de paradigma, mientras antes el acceso a metabolitos dependía casi exclusivamente del cultivo, hoy en día se recurre a enfoques ómicos que complementan dicha estrategia. Estas herramientas permiten identificar y evaluar metabolitos previamente no caracterizados, fortaleciendo así el papel de la química analítica como disciplina clave dentro de la biotecnología moderna. Este enfoque integrado ha permitido no solo ampliar el repertorio de compuestos con potencial terapéutico, sino también sentar las bases para el diseño racional de nuevas entidades moleculares. Así, surge la posibilidad de desarrollar “moléculas de diseño” mediante estrategias de biología sintética y

modelamiento computacional, orientadas a la producción eficiente y dirigida de compuestos con valor farmacológico o industrial (154). El análisis de datos biológicos requiere comprender los principios físico-químicos que rigen la biología molecular. Debido al volumen y complejidad de la información generada, resulta indispensable aplicar herramientas computacionales de alto rendimiento capaces de analizar, modelar y transformar esos datos en conocimiento biológicamente significativo (155). En este contexto, la bioinformática no solo agiliza los procesos de análisis, sino que también permite formular hipótesis funcionales y estructurales con valor experimental. A través del uso de software especializado y aproximaciones como MMPBSA, se ha podido predecir el comportamiento estructural y energético de los complejos proteína-ligando en condiciones similares a las fisiológicas y que confirman la alta afinidad. En el ámbito biotecnológico, estos hallazgos respaldan el potencial de dichos compuestos como inhibidores en el tratamiento de la osteoartritis y evidencian el valor estratégico de la bioinformática. Al predecir con alta fidelidad las interacciones moleculares antes de la validación experimental, se acelera la selección de candidatos terapéuticos, se reducen los costos preclínicos y se optimizan los recursos disponibles. En consecuencia, la bioinformática se consolida como una herramienta esencial en la biotecnología moderna, al integrar el análisis computacional con aplicaciones orientadas al desarrollo de soluciones terapéuticas innovadoras (156).



## **CAPÍTULO 2**

# **METODOLOGÍA**

## 2.1 Detalles Computacionales

### 2.1.1 Hardware

Durante todo el proceso metodológico se utilizó una estación de cómputo de alto rendimiento equipada con el sistema operativo Ubuntu de 64 bits, basado en Debian. El equipo cuenta con un procesador AMD® Ryzen 9 5950X de 16 núcleos y 32 hilos, 64 GB de memoria RAM, tres discos duros de 1 TB, 4 TB y 6 TB, y dos tarjetas gráficas: GTX 980 y NVIDIA GeForce RTX 3080 Ti.

### 2.1.2 Base de datos

Para el desarrollo de este estudio, se emplearon diversas bases de datos y herramientas computacionales especializadas en modelado molecular y dinámica molecular.

#### 2.1.2.1 PDB

El Protein Data Bank (PDB) (157) es una base de datos fundamental en la biología estructural, proporcionando acceso abierto a estructuras tridimensionales de las macromoléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos. Almacena más de 155,000 estructuras de proteínas, ADN y ARN a nivel atómico, determinadas experimentalmente mediante cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (NMR) y microscopía electrónica tridimensional (3DEM). Desde su creación, ha evolucionado para atender a una comunidad científica en constante crecimiento, facilitando avances en biomedicina, biotecnología y bioingeniería (158)(159).

#### 2.1.2.2 PubChem

PubChem (160) es una plataforma de acceso público gestionada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. Su base de datos contiene información química detallada, incluyendo estructuras en 2D y 3D, así como propiedades físicas, químicas y datos de reactividad. Aunque se centra principalmente en moléculas pequeñas, también abarca una amplia variedad de compuestos, como siRNA, miRNA, carbohidratos, lípidos, péptidos y macromoléculas químicamente modificadas (161).

### 2.1.3 Servidores

#### 2.1.3.1 GROMACS 2022.3

GROMACS (162) es un software de código abierto que se utiliza en la MD. Permite realizar diversos tipos de cálculos y ofrece herramientas computacionales avanzadas para la preparación, análisis y estudio de energía libre (163).

#### 2.1.3.2 UCSF Chimera

UCSF Chimera (164) es un software de visualización y análisis estructural que integra información de secuencias de proteínas con estructuras tridimensionales. Ofrece ventajas como su capacidad para una visualización avanzada, métodos únicos para análisis de secuencia-estructura, documentación detallada y desarrollo continuo de una corrida computacional (165).

#### 2.1.3.3 AutoDock Vina

AutoDock Vina es un programa de código abierto ampliamente usado en el acoplamiento molecular. Las dinámicas conformacionales desarrollan acoplamientos moleculares en múltiples de los ligandos. El objetivo es predecir las conformaciones de límite y la afinidad de enlace para la predicción más eficiente de unión (166)(167).

#### 2.1.3.4 Gaussian 16 y GaussView 6

Gaussian 16 es un software de química computacional utilizado para predecir energías, estructuras moleculares, frecuencias vibratorias y otras propiedades fisicoquímicas de los compuestos como ejecución en segundo plano sin interfaz visual propia (168). GaussView 6 es la interfaz gráfica nativa del sistema gaussiano, es decir, permite interactuar con Gaussian16 de una manera gráfica y más sencilla (169).

#### 2.1.3.5 PDBSum

PDBSum es una plataforma web que ofrece un análisis de la arquitectura estructural de complejos proteína-ligando a partir de datos del PDB. Mediante representaciones gráficas y descripciones detalladas, proporciona información sobre la organización de la estructura secundaria, las interacciones moleculares y otros parámetros estructurales clave, facilitando una caracterización integral a nivel atómico (170).

#### 2.1.3.6 LigParGen

LigParGen (171)(172)(173) es un servidor web que automatiza la generación de parámetros de

campo de fuerza OPLS-AA para moléculas orgánicas, permitiendo su integración eficiente en simulaciones de dinámica molecular (MD). Su diseño simplifica la asignación de parámetros y la creación de archivos compatibles con los principales paquetes de simulación (173).

#### *2.1.3.7 MMPBSA*

MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area) (174) es un enfoque computacional ampliamente utilizado para la estimación de energías libres de unión en interacciones biomoleculares, particularmente en el estudio de complejos proteína-ligando. Este método, basado en simulaciones de dinámica molecular, representa un compromiso entre precisión y eficiencia computacional, situándose entre los modelos empíricos de puntuación y los rigurosos métodos de perturbación (175)(176).

#### *2.1.3.8 APBS*

APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) (175) es un software diseñado para poder resolver ecuaciones de electrostática continua en grandes ensamblajes biomoleculares, tiene aplicaciones en química, biología y biomedicina. En este contexto, sirve para calcular la electrostática de biomoléculas en solución mediante la resolución de la ecuación de Poisson-Boltzmann. Es ampliamente utilizado en estudios de solvación, interacciones biomoleculares, estabilidad de macromoléculas y cálculos de energía libre en sistemas biológicos (177).

## **2.2 Metodología**

### ***2.2.1 Extracción de la proteína***

En esta investigación, se empleó la metaloproteinasa MMP-13, que como se mencionó, es una enzima fundamental en la degradación de la matriz extracelular y estrechamente implicada en los procesos inflamatorios asociados a la OA. Su estructura cristalina fue obtenida del Protein Data Bank (PDB) en formato .pdb por medio del ID 3ZXH (178), constituyendo el modelo de referencia para las simulaciones y posteriormente para los análisis computacionales.

### ***2.2.2 Modelado de la proteína***

Para el modelado de la proteína se utilizó UCSF Chimera para limpiar la estructura, eliminando moléculas y solventes no pertenecientes a la proteína (por ejemplo, HOH, GOL, E41 e iones de

calcio). Posteriormente, se extrajo la cadena principal B y se completó su secuencia mediante el módulo integrado de Chimera Modeller, utilizando la línea de comandos para incorporar los aminoácidos faltantes. Cabe destacar que se conservaron los dos iones de  $Zn^{+}$  presentes, dado que son esenciales para la actividad de la MMP-13.

### 2.2.3 Edición del campo de fuerza OPLSAA para Zinc

Como se mencionó anteriormente, las metaloproteinasas son dependientes del zinc, por lo que es fundamental conservar el ion  $Zn^{+}$  en su posición durante la simulación de dinámica molecular. No obstante, el campo de fuerza empleado es el OPLS-AA en GROMACS, y este no incluye parámetros para el Zn, lo que requiere realizar ajustes en la parametrización para incorporarlo correctamente.

#### 2.2.3.1 Modificación del campo de fuerza

Para poner añadir al ion  $Zn^{2+}$ , se realizaron modificaciones en los archivos correspondientes dentro del directorio del campo de fuerza, los archivos que se editaron fueron:

- ions.itp: Para definir al ión  $Zn^{2+}$  como una molécula independiente con carga +2.
- atomtypes.atp: Para agregar al  $Zn^{2+}$  como tipo de átomo.

**Tabla 2.1**

Parámetros principales del ión  $Zn^{2+}$

Parámetro	Valor
Masa (g/mol)	65.38
Carga (e)	+2
Tipo de átomo	opls_412b
Sigma (nm)	0.210

Fuente: Adaptación propia de GROMACS OPLS-AA force field.

- aminoacids.rtp: Para incluir al  $Zn^{2+}$  como residuo reconocible.
- ffnonbonded.itp: Según literatura, se añaden las interacciones no enlazadas para  $Zn^{2+}$ .

En la Tabla 2.1, se presentan los parámetros definidos para el  $Zn^{2+}$ .

### 2.2.3.2 Definición de restricciones de distancia

Para mantener la estabilidad del  $Zn^{2+}$  con la proteína durante la simulación, se establecieron restricciones de distancia. Estas restricciones se añadieron en un archivo de parámetros (`distance_restraints.itp`) por medio del archivo PDB en Chimera.

### 2.2.3.3 Ajustes en el archivo de los parámetros de simulación (.mdp)

Se realizaron ajustes en los archivos de la dinámica molecular (.mdp), activando restricciones y residuos. Y el resumen de las modificaciones se presenta en la Tabla 2.2:

**Tabla 2.2**

Archivos modificados y cambios realizados

Archivo	Modificación realizada
<code>ions.itp</code>	Inclusión de los parámetros del ion $Zn^{2+}$
<code>distance_restraints.itp</code>	Definición de restricciones de distancia para $Zn^{2+}$ y los residuos coordinadores.
<code>.mdp</code>	Ajustes en los parámetros de simulación para considerar las restricciones de $Zn^{2+}$ ( <code>disre=Simple</code> )

Fuente: Elaboración propia.

### 2.2.4 Cálculo de cargas atómicas

Para la parametrización de la proteína, se empleó el campo de fuerza OPLS-AA en GROMACS. Para ello, se llevaron a cabo cálculos de química cuántica mediante Gaussian 16 y GaussView

6, donde se determinaron las cargas Hirshfeld utilizando la teoría del Funcional de la Densidad (DFT).

### ***2.2.5 Simulación de Dinámica Molecular de la proteína***

La simulación de dinámica molecular de la proteína se realizó utilizando el software GROMACS 2022.3. Primero, se llevó a cabo la minimización de energía para eliminar tensiones estructurales y solapamientos atómicos en la estructura proteica. Luego, el sistema fue solvatado con el modelo de agua TIP3P y se añadieron contraiones para neutralizar la carga neta. A continuación, se realizó la equilibración en dos fases:

- **NVT:** Se estabilizó la temperatura del sistema a un valor fisiológico, permitiendo que las moléculas de agua y la proteína alcanzaran un equilibrio térmico.
- **NPT:** Se ajustó la presión y la densidad del sistema para replicar condiciones experimentales más realistas.

### ***2.2.6 Estabilidad de la proteína***

La estabilidad estructural de la proteína se evaluó mediante el análisis de RMSD (Root Mean Square Deviation), RMSF (Root Mean Square Fluctuation) y radio de giro (Rg). Estos parámetros fueron calculados a lo largo de la simulación para determinar la conformación y flexibilidad de la proteína. Los resultados indicaron que la estructura alcanzó un estado estable, con variaciones dentro de rangos aceptables, lo que sugiere una conformación bien equilibrada durante la dinámica molecular. Como resultado, la proteína estabilizada se empleó en la siguiente etapa del estudio, donde se llevó a cabo la dinámica molecular en presencia de los ligandos.

### ***2.2.7 Extracción de flavonoides naturales y el sintético***

Los flavonoides utilizados en el estudio fueron obtenidos de la base de datos PubChem, cada uno con su código respectivo.

- **Flavonoides naturales:** Rutina (RUT ID:5280805), Nicotiflorina (NIC ID: 5318767), Orientina (ORI ID: 5281675), Vitexina (VIT ID: 5280441) y Apigetrina (API ID: 5280704).

- **Inhibidor sintético:** CL82198 (CL8 ID: 2777).

Las estructuras fueron descargadas en formato SDF y posteriormente visualizadas mediante el software UCSF Chimera para su análisis estructural.

### 2.2.8 *Determinación de la complejidad*

Para la parametrización de los ligandos con la proteína, se utilizó el servidor web LigParGen, el cual generó automáticamente las cargas atómicas compatibles con el campo de fuerza OPLS-AA a partir del archivo *.pdb* de cada uno de los ligandos con la proteína. A partir de este, se obtuvieron los archivos *.itp* y *.gro* de todos, que son esenciales para la simulación en GROMACS. Adicionalmente, se realizaron cálculos de química cuántica mediante Gaussian 16 y GaussView 6, donde se determinaron las cargas Hirshfeld a partir de cálculos DFT. Las cargas fueron utilizadas para mejorar la precisión en la representación electrostática del ligando antes de emplear la aplicación de la simulación de dinámica molecular.

### 2.2.9 *Acoplamiento molecular “Docking”*

El acoplamiento molecular se realizó utilizando el software AutoDock Vina, configurado para generar 1000 interacciones de acoplamiento para cada uno de los seis complejos proteína-ligando. Posteriormente, se seleccionaron las conformaciones con la menor energía de acoplamiento para su análisis estructural y evaluación de interacciones clave.

#### 2.2.9.1 *Minimización y equilibrio Proteína-Ligando*

El sistema proteico fue minimizado con cada uno de los ligandos y luego fueron equilibrados todos los complejos. La minimización se realizó a doble precisión. Posteriormente, se realizó el equilibrio del sistema en dos etapas:

- **Ensamblés NVT:** Se llevó a cabo una simulación de 10 ns a 309.65 K para estabilizar la temperatura del sistema.
- **Ensamblés NPT:** Seguidamente se realizó una simulación de 200 ns, con la temperatura en 309.65 K y una presión de 1 bar para la estabilización de la presión y densidad del sistema.

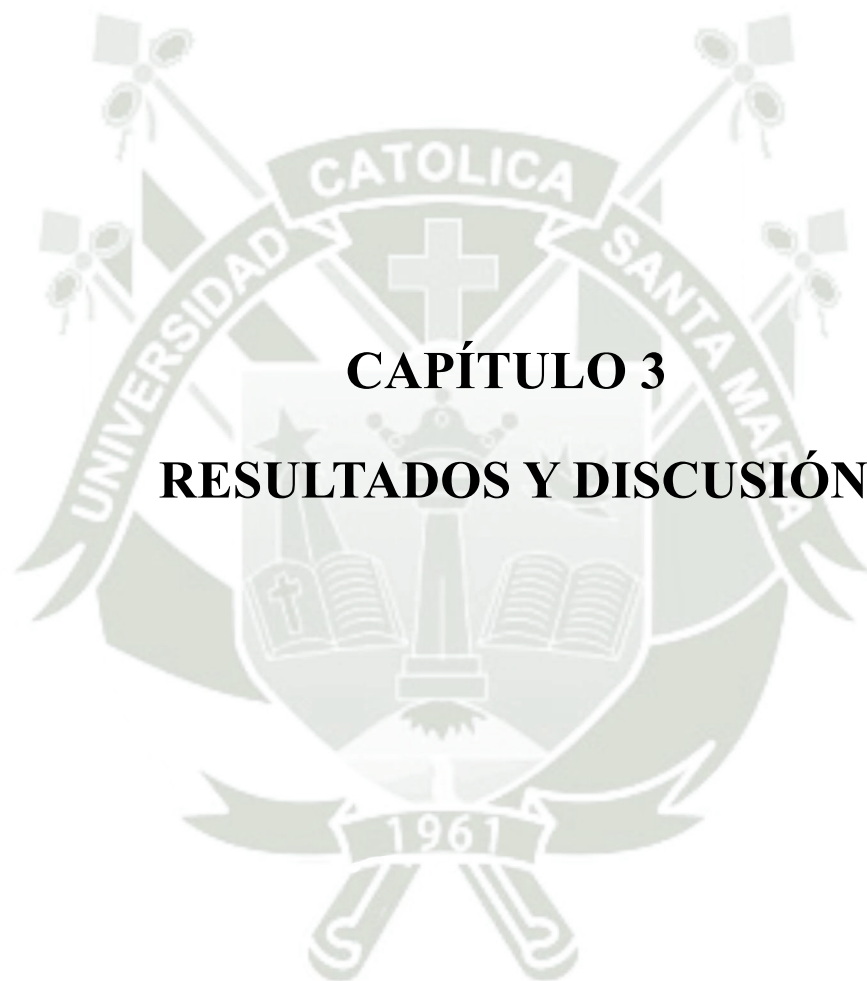
Estó permitió que los complejos de proteína-ligando alcanzaran su estado estable.

### ***2.2.10 Análisis post-equilibrio***

Previo a la visualización y análisis estructural, se eliminaron las condiciones de periodicidad de todos los complejos. Posteriormente, se verificaron parámetros de estabilidad estructural como RMSD, RMSF y Radio de Giro, asegurando que las conformaciones alcanzadas fueran representativas del estado de equilibrio. Además, para un análisis estructural más detallado, se empleó PDBsum, lo que permitió evaluar las interacciones secundarias, la composición de los elementos estructurales secundarios y la presencia de puentes de hidrógeno.

### ***2.2.11 Análisis de energías de interacción***

Para el análisis post-equilibrio, se llevó a cabo la estimación de la energía libre de unión  $\Delta G_{int}$  (kcal/mol) utilizando la metodología MMPBSA, promediando las energías de enlace de cada frame dentro de la región estable de la simulación de dinámica molecular, con un intervalo de 0.5 ns. La identificación de estas regiones estables se realizó mediante gráficos de RMSD, asegurando así una mayor precisión en los cálculos energéticos. El cálculo de la energía de enlace promedio se realizó con `g_mmpbsa`, un script en Python ejecutado en un entorno Linux, generando los archivos de salida "full\_energy.dat" "summary\_energy.dat", los cuales contienen los valores promediados y sus desviaciones estándar de los diferentes componentes energéticos.



## **CAPÍTULO 3**

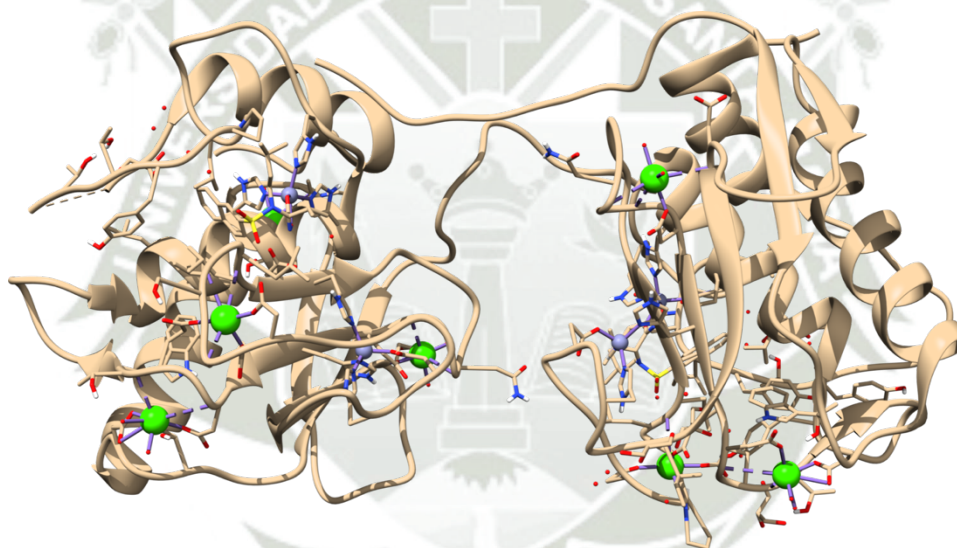
# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1 Estructura de la proteína

El sistema proteico de interés, la metaloproteínasa de matriz MMP-13 (colagenasa 3), fue obtenido de la base de datos Protein Data Bank (PDB), con el identificador 3ZXH (179). Su estructura cristalina fue visualizada y analizada utilizando el software UCSF Chimera (ver figura 3.1). Es importante considerar que, el archivo original contenía dos cadenas de la enzima, así como residuos de solvente y moléculas empleadas en el proceso de cristalización. Además, se identificaron átomos de calcio (representados en color verde) y dos átomos de zinc por cada cadena (representados en color morado), ambos elementos esenciales para la función estructural y catalítica de la enzima.

**Figura 3.1**

Estructura tridimensional de la metaloproteínasa de matriz 13 (MMP-13).



Fuente: Elaboración propia en UCSF Chimera a partir de la estructura cristalográfica depositada en el Protein Data Bank (PDB ID: 3ZXH)

Por otro lado, debemos mencionar que las cadenas proteicas se hallan incompletas y debemos realizar el llenado de los vacíos mediante algún método adecuado, para ello hemos seleccionado el método por Homología para lo que se utilizara el servidor en línea Modeller. En este sentido, hicimos uso de una cuenta autorizada por Modeller, con licencia académica, para que a través del software UCSF-Chimera, procedamos a en primer lugar seleccionar la cadena y completar los residuos perdidos.

**Figura 3.2**

En la imagen se muestra la secuencia antes y después del completado por homología.

```

chain B: collagenase 3
File Edit Structure Headers Numberings Tree Info Preferences
3zxh (#0) chain B 104 YNVFPRTLKWSKMNLTYRIVVNYTPDMTHSEVEKAFKKAFKVWSDV TPLNLF
3zxh (#0) chain B 154 TRLHDG IAD IMISFG I KEHGDFYPFDGPSGLLAHA FPPGPNYGGDAHFDD
3zxh (#0) chain B 204 DE TWTSSSKGYNL FLVAAHEFGHSLGLDHSKDPGALMFP IYTYTGKSHFM
3zxh (#0) chain B 254 LPDDDVQGIQSLYGP GDEDPN
    
```

(a) Se observan los aminoácidos de la cadena B de la proteína 3ZXH, en la que se evidencia la ausencia de ciertos residuos

```

chain B: collagenase 3
File Edit Structure Headers Numberings Tree Info Preferences
3zxh (#0) chain B 104 YNVFPRTLKWSKMNLTYRIVVNYTPDMTHSEVEKAFKKAFKVWSDV TPLNLF
3zxh (#0) chain B 154 TRLHDG IAD IMISFG I KEHGDFYPFDGPSGLLAHA FPPGPNYGGDAHFDD
3zxh (#0) chain B 204 DE TWTSSSKGYNL FLVAAHEFGHSLGLDHSKDPGALMFP IYTYTGKSHFM
3zxh (#0) chain B 254 LPDDDVQGIQSLYGP GDEDPN
    
```

(b) Se muestra la misma cadena tras haber sido completada con el programa Modeller

Fuente: Elaboración propia en UCSF Chimera a partir de la estructura cristalográfica depositada en el Protein Data Bank (PDB ID: 3ZXH)

Se seleccionó la cadena B, la cual presentaba secuencias incompletas; por ello, procedimos a completar la estructura utilizando el servidor en línea Modeller. Tanto la secuencia original incompleta como la versión completada pueden observarse en la Figura 3.2. Si bien la numeración de los residuos no inicia en 1 -ya que originalmente comenzaba en el residuo 104-, se aplicó una renumeración para iniciar desde el residuo 1, asegurando la numeración consecutiva y coherente a lo largo de toda la cadena. Esta enumeración facilitó el análisis estructural posterior. Finalmente se obtuvo una cadena continua compuesta por un total de 171 aminoácidos.

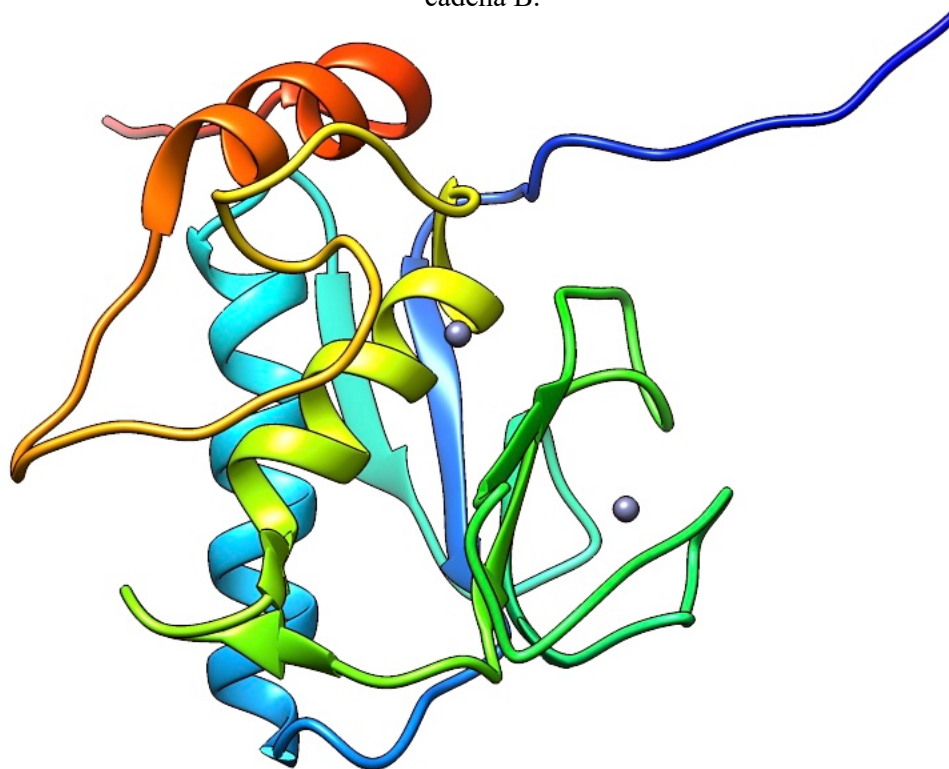
En la figura 3.2a, el recuadro de rojo, son los aminoácidos perdidos, los cuales se completaron por homología, lo que en la figura 3.2b podemos observar que ya está completada.

El resultado de la proteína completa la podemos observar en la Figura 3.3, donde podemos apreciar en una escala de colores de arcoíris (sin mayor significancia que la representación), donde se han conservado los átomos de Zinc, los cuales se hallan representados de color morado. Es esta proteína, la que utilizaremos para el proceso de simulación de dinámica molecular. En la imagen,

se muestra la estructura completa de la proteína, resaltando la presencia de los iones de zinc (Zn), los cuales desempeñan un papel clave en su actividad catalítica. La visualización permite identificar la organización estructural de la proteína, incluyendo sus regiones de hélices alfa y láminas beta.

**Figura 3.3**

Representación tridimensional de la metaloproteínasa MMP-13 completa en la cadena B.



Fuente: Elaboración propia en UCSF Chimera a partir del PDB.

Los metabolitos secundarios utilizados como ligandos para la interacción con la proteína fueron seis: cinco flavonoides naturales y un compuesto sintético, identificado como *un prometedoro tratamiento para la osteoartritis* (OA) a través de la inhibición de la MMP-13. Estos metabolitos fueron obtenidos de la base de datos PubChem y se describen en la Tabla 3.1.

Los metabolitos empleados pueden observarse en la Figura 3.4, donde se representan sus estructuras químicas en 2D. Todas las moléculas presentan el esqueleto característico de los flavonoides, compuesto por dos anillos aromáticos unidos por un sistema oxigenado. La presencia

de grupos hidróxido (-OH) y cetonas (C=O) les confiere sus propiedades antioxidantes. Se diferencian en dos subgrupos principales: las flavonas, que carecen de un grupo -OH en la posición C3, y los flavonoles, que poseen un -OH en C3, formando parte del amplio grupo de los flavonoides.

**Tabla 3.1**

Metabolitos secundarios y el compuesto sintético que fueron utilizados en el presente estudio.

<b>Metabolito</b>	<b>PubChem ID</b>	<b>Codificación</b>
Rutina	5280805	RUT
Nicotiflorina	5318767	NIC
Orientina	5281675	ORI
Vitexina	5280441	VIT
Apigetrina	5280704	API
Cl-82198	2777	CL8

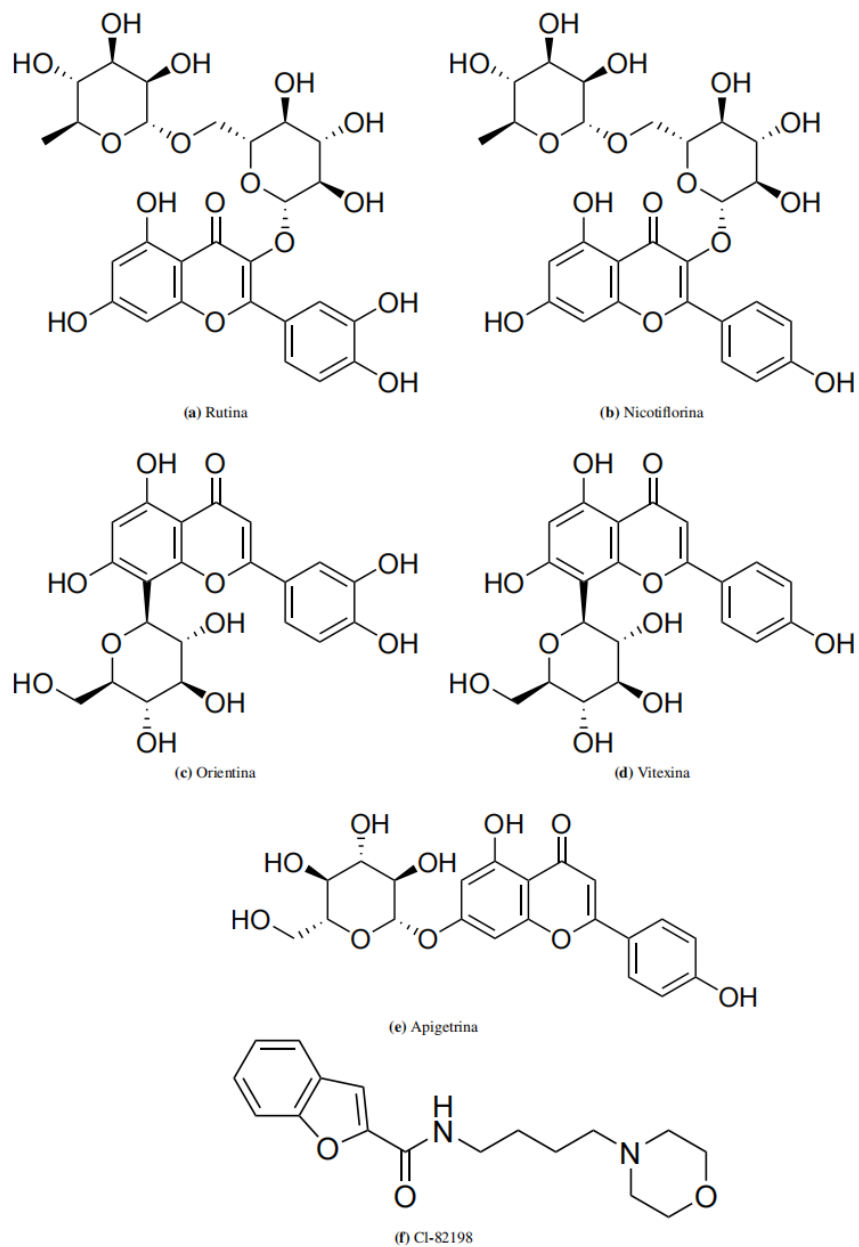
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem (160).

Para realizar la estabilización de nuestra proteína como para todos los metabolitos secundarios, se hizo uso del campo de fuerza OPLS-AA, en el caso de los átomos de Zinc, tuvimos que incorporar la definición adecuada de los parámetros requeridos, como el mantener en forma restringida la región de movimiento de los átomos de Zinc; por lo que se definió el campo de fuerza `opls_412b` dentro de la paquetería de Gromacs, para el caso de los metabolitos secundarios, la definición de los átomos no es estándar dentro del campo de fuerza OPLS-AA, para lo que tuvimos que hacer uso del servidor de la Universidad de Moscú (<http://erg.biophys.msu.ru>).

Adicionalmente, corregimos las cargas mediante la aproximación de Hirshfeld, lo cual fue calculado en el paquete computacional Gaussian 16.

**Figura 3.4**

Estructuras químicas de los metabolitos secundarios y del inhibidor sintético



Fuente: Elaboración propia mediante el Software ChemDraw.

La restricción de la posición para los dos átomos de Zinc, fue agregado en el archivo de topología, introduciendo las siguientes líneas que se muestran en la Figura 3.5.

**Figura 3.5**

Archivo de parámetros de la distancia de restricción empleada

```
[ distance_restraints ]  
  
; ai  aj  type  index  type'  low  up1  up2  fac  
2638 1866  1    0    1    0.0  0.15  0.25  1.0  
2638 1926  1    1    1    0.0  0.15  0.25  1.0  
2638 2012  1    2    1    0.0  0.15  0.25  1.0  
2639 1155  1    3    1    0.0  0.15  0.25  1.0  
2639 1175  1    4    1    0.0  0.15  0.25  1.0  
2639 1366  1    5    1    0.0  0.15  0.25  1.0  
2639 1528  1    6    1    0.0  0.15  0.25  1.0
```

Fuente: Elaboración propia. Donde “ai” y “aj” corresponden a los índices atómicos asignados a los iones  $Zn^{2+}$  en la proteína.

Donde la primera columna nos indica el número del átomo metálico, y la segunda columna nos indica el átomo de algún residuo que interacciona con el átomo metálico. La tercera y quinta columna nos indica el tipo de interacción, si es simple, doble o de cualquier otro tipo, la cuarta columna es el índice interno de la declaración de la restricción de la posición, esta siempre debe empezar en cero; la sexta columna nos indica el valor más bajo para la distancia entre los dos átomos que estamos restringiendo, por defecto es siempre cero; la séptima y octava columna nos representa a la distancia mínima de enlace y la distancia máxima de enlace en la que se puede mover los átomos que estamos restringiendo; y la novena columna define el factor por el que es multiplicado la distancia en caso de exceder la interacción.

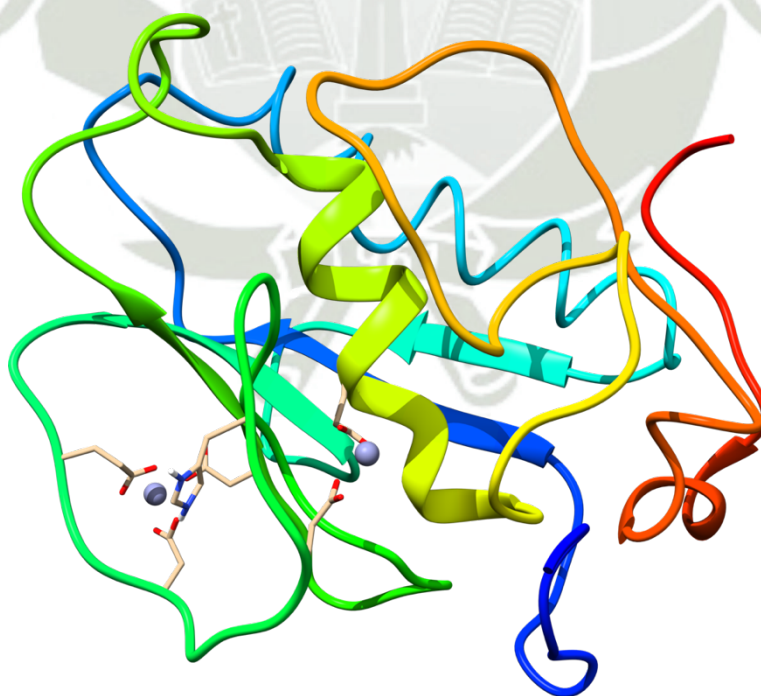
Una vez definidos los requerimientos del campo de fuerza tanto para la proteína como para los metabolitos secundarios, se procedió a la estabilización, el primer paso fue introducir la proteína en una caja cuya distancia de los extremos hacia la pared de la caja fue de 1 nm, en este paso también

renombramos la numeración en uno de los residuos y se mantuvo el nombre de la cadena en B; exigimos que la caja fuera cúbica.

El siguiente paso fue generar las topologías necesarias mediante el programa pdb2gmx de Gromacs, con esta información, se continuó con la solvatación de nuestra proteína en el sistema cubico, y la neutralización del sistema, en cuyo caso agregamos iones salinos en una concentración de 0.15M, para simular el sistema en condiciones fisiológicas. La siguiente etapa fue la minimización de las fuerzas en el sistema, para evitar movimientos no deseados durante la simulación de dinámica molecular, se exigió un delta en la energía de 1.0 kJ/mol, como criterio de convergencia. Una vez minimizado el sistema, se introdujo la temperatura, mediante el termostato de modificado de Verlet, activado con el comando V-rescale, para esto se realizó una simulación de 10ns, con una temperatura de referencia de 309.65K, y una  $\tau$  de temperatura de 0.1 (máxima variación). Una vez culminada esta etapa, procedimos a la simulación de dinámica molecular introduciendo el barostato de Parrinello–Rahman, con una presión de referencia de 1.0Bar y una variación de 0.1. El tiempo de simulación para esta etapa fue de 600ns.

**Figura 3.6**

Estructura 3ZXH al final de la Simulación de Dinámica Molecular.



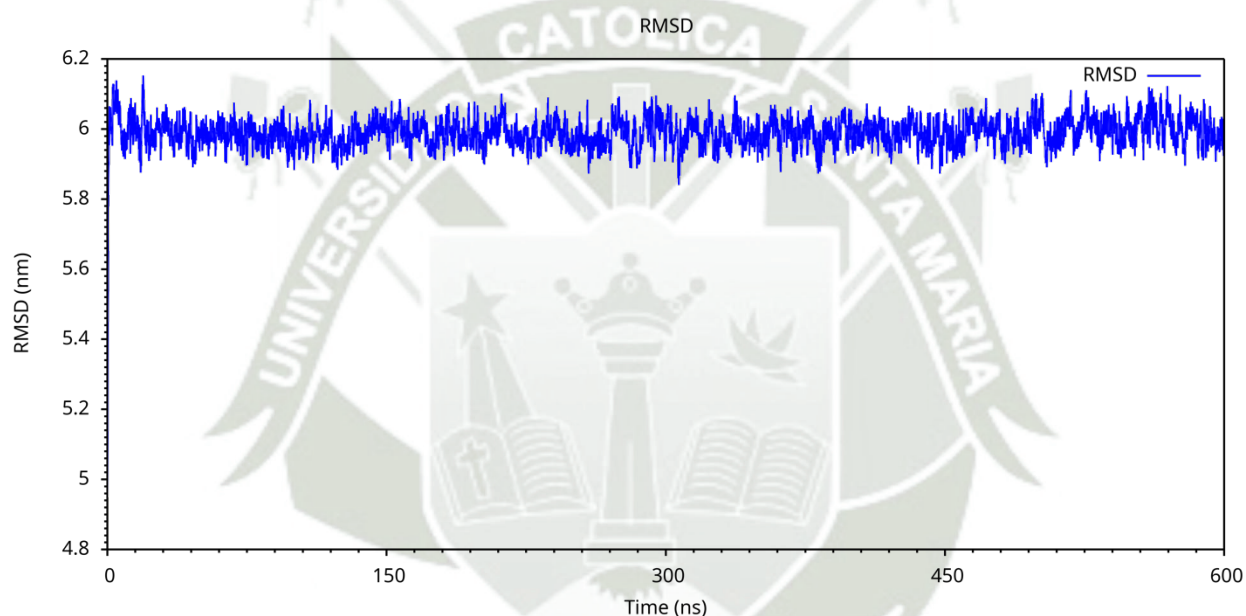
Fuente: Elaboración propia en UCSF Chimera a partir del PDB.

Tras completar la simulación de dinámica molecular, se comprobó que los átomos de zinc permanecieron dentro de las restricciones espaciales establecidas. En la estructura final se aprecia la pérdida o elongación de algunas  $\alpha$ -Hélice, mientras que las hojas- $\beta$  se conservaron sin cambios significativos (Figura 3.6).

Para poder determinar si se llegó a la región de equilibrio, se realizó el cálculo de la raíz de la desviación media cuadrática (RMSD) durante la trayectoria de 600ns, como se puede observar en la Figura 3.7.

**Figura 3.7**

RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular de la Proteína.



Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

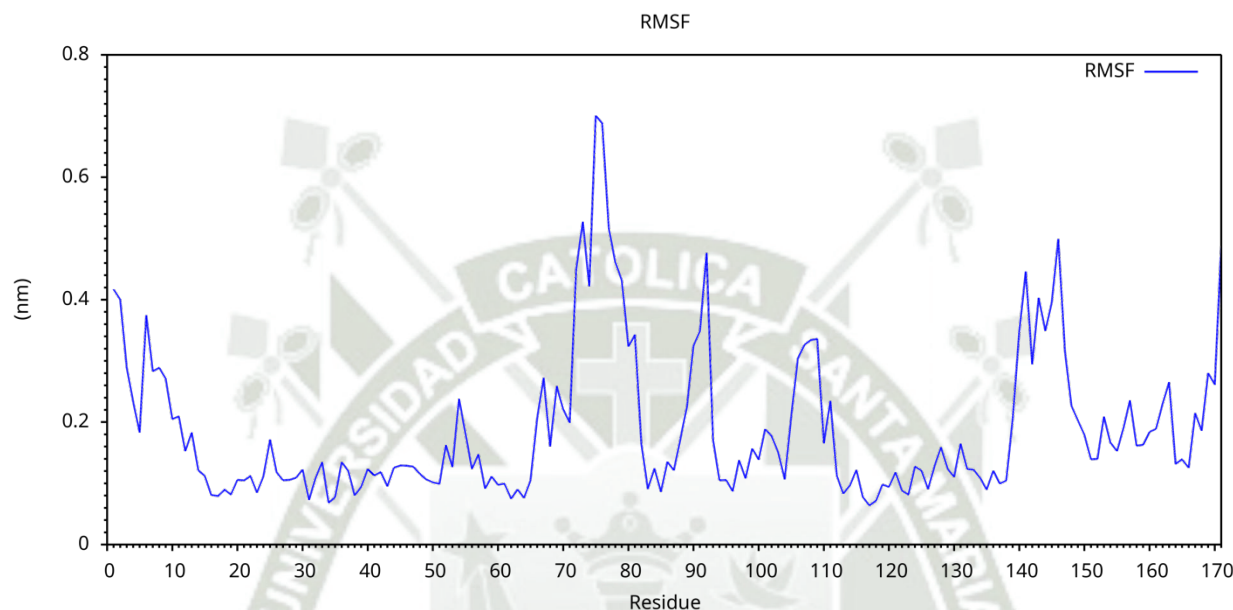
Normalmente se espera una fluctuación de 0.2nm en la oscilación entre el pico mas alto y el valle mas profundo en una determinada región de la gráfica para indicar que se halla en el equilibrio, esto es una concertación empírica, para poder indicar que se halla en el estado de equilibrio. En nuestro resultado, podemos observar que desde los 10ns se ha ingresado al estado de equilibrio, y solo la estructura ha vibrado en el resto de la trayectoria de la simulación de dinámica molecular. Así entonces, podemos indicar desde la fluctuación de las distancias, que nuestro sistema se halla ya en su estado de equilibrio.

Para poder ahora analizar que regiones de la proteína aportan más a la fluctuación, realizamos el cálculo de la raíz de la fluctuación media estándar por residuo (RMSF) para cada uno de los

residuos. Estos resultados son presentados en la Figura 3.8, en esta gráfica, se ha calculado la fluctuación para los 171 residuos, para toda la trayectoria.

**Figura 3.8**

RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular de la Proteína



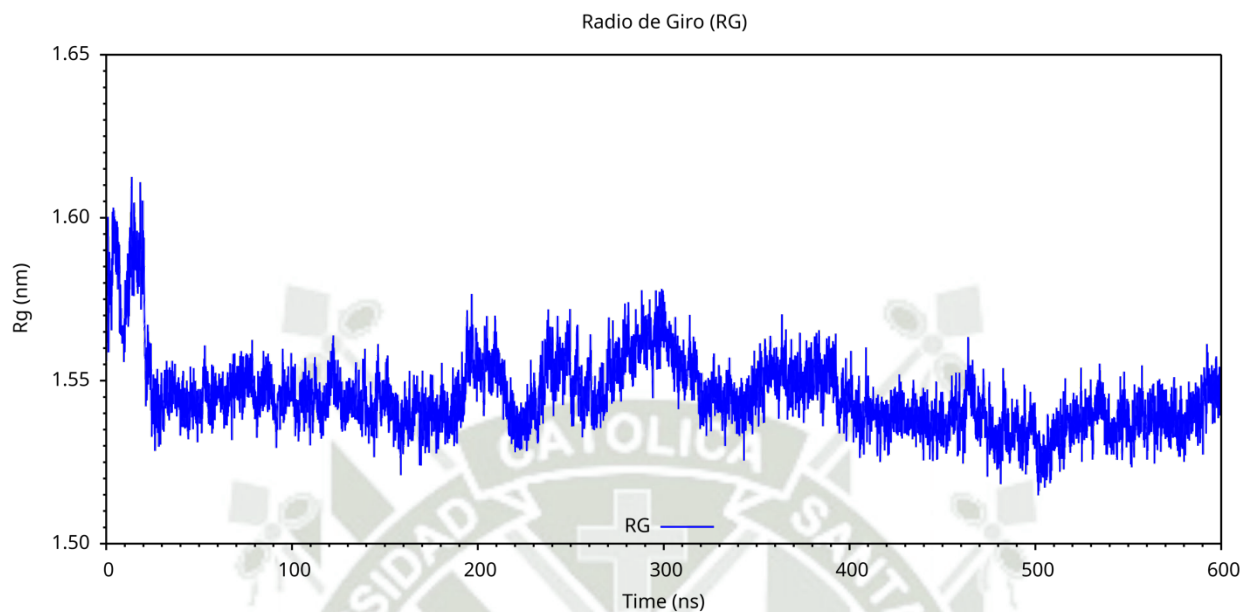
Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

Observamos que la región comprendida entre los residuos 70 al 82, del 85 al 95, del 105 al 112 y 138 al 150, son las regiones que más han contribuido a la fluctuación de nuestra proteína, cabe resaltar que las regiones que interactúan con los átomos de Zinc, se halla vinculados con los picos de la gráfica, esto se puede explicar por el efecto de vibración adicional que aportan los átomos de Zinc en estas zonas.

Por otro lado, es importante revisar la compresibilidad de la proteína, ya que normalmente esto está asociado con la estabilidad, es decir a mayor compactación mayor estabilidad del sistema protéico, en la Figura 3.9, podemos observar que durante la trayectoria, la proteína, inicialmente gana estabilidad por compactación, en los 30 primeros nanosegundos, seguida de una región en la gráfica de compactación leve, pero entre los 190ns y 380ns, la estructura pierde compactación, para posteriormente nuevamente iniciar un proceso de compactación hasta el final de la simulación de dinámica molecular.

**Figura 3.9**

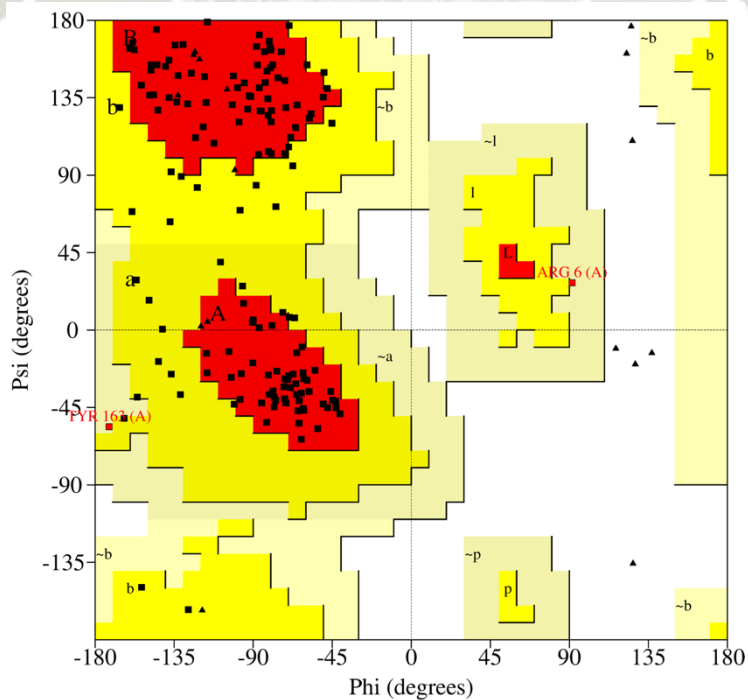
Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular de la Proteína.



Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

**Figura 3.10**

Diagrama de Ramachandran de la Simulación de Dinámica Molecular de la Proteína.

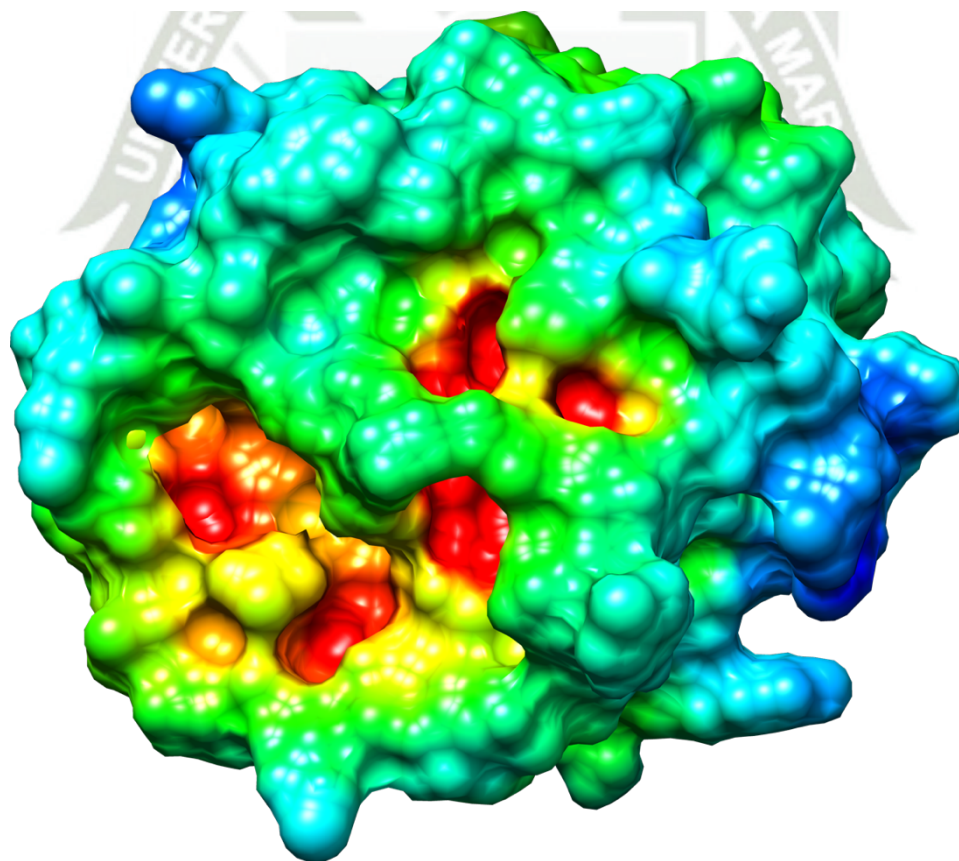


Fuente: PDBsum a partir de la estructura generada.

En la Figura 3.10, presentamos el análisis del Diagrama de Ramachandran, que nos habla de su ocurrencia natural, es decir mientras mayor se el porcentaje de regiones permitidas y favorecidas, la ocurrencia de la proteína en la naturaleza, esta garantizada. Para nuestro caso de estudio, nuestra proteína presenta un total de 111 residuos en las regiones más favorecidas lo que hace un 79.3%, y en la region favorecida presenta un total de 27 residuos con un porcentaje de 19.3% y dos residuos en la región generosamente favorecidas lo que equivale a un 1.4%, este conteo se realiza sobre todos los residuos que no sean glicina ni prolina, que en nuestra proteína hacen un total de 140 residuos, lo que implica que 31 residuos son glicina, prolinas o preprolinas. Podemos concluir de esto que nuestra proteína estabilizada, existe en la naturaleza ya que el porcentaje del diagrama de Ramachandran es de un 100%.

**Figura 3.11**

APBS de la Proteína final después de Simulación de DM de la Proteína.



Fuente: Elaboración propia en UCSF Chimera.

Para identificar las regiones hidrofóbicas e hidrofóbicas, realizamos el cálculo del potencial electrostático bajo la aproximación APBS, como se muestra en la Figura 3.11, podemos ver que existen en la parte superficial restos aminoacídicos que confieren a la estructura una carga no normal positiva (esto se halla en las regiones coloreadas de azul), mientras que en dos cavidades de nuestra proteína presentan carga parcial no formal negativa (esto se halla en las regiones coloreadas de rojo), esto lo podemos ver claramente por la coloración en la hipersuperficie de potencial.

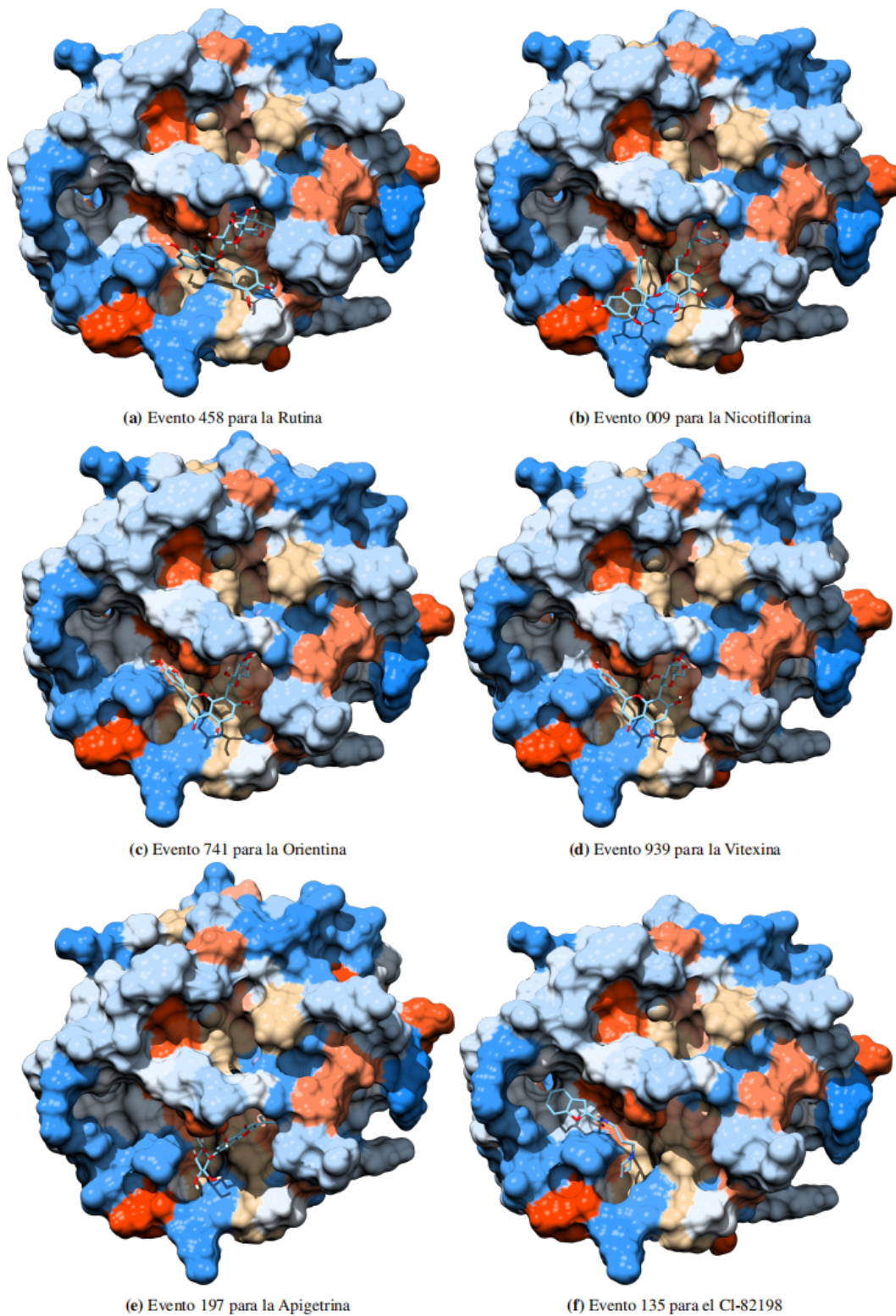
### 3.2 Estructura del complejo proteína-ligando respectivamente

Ya estabilizada la proteína, procedió a realizar el ensamblaje correspondiente entre los potenciales inhibidores junto con la MMP-13 en su estado de equilibrio, utilizando el *docking molecular*, para ello realizamos un total de 1000 eventos con diez repeticiones por evento, lo que hizo un total de 10000 ocurrencias por cada uno de nuestros metabolitos secundarios. Para cada uno de los metabolitos secundarios del total de los eventos, se eligió la configuración estructural de menor energía libre de interacción. Estamos claro de que esas energías libres de interacción solo son referenciales, debido a que el campo de fuerza utilizado por el Autodock-Vina, es uno que solo considera los términos no enlazantes, por ello consideramos los casos de menor energía pero que tenga el máximo puntaje de ocurrencia (Score).

En la Figura 3.12, se presentan los resultados del ensamblaje realizado para los seis ligandos (metabolitos secundarios), con la proteína 3ZXH completamente estabilizada en su estado de equilibrio, el modo del ensamblaje fue bajo la aproximación rígido-flexible, es decir se mantuvo la proteína en forma rígida y el ligando fue considerado en forma flexible, donde los movimientos o grados de libertad del ligando se consideraron los simples enlaces, ya que estos pueden sufrir rotación configuracional. De todos los eventos realizados para cada caso, elegimos la configuración del ensamble con la mayor ocurrencia de veces, que a su vez es la que tiene la mejor energía de interacción (menor valor de la energía libre de interacción). Para el caso de la Rutina, el evento que presentó el máximo score (veces que el evento se repite con mayor frecuencia y que adicionalmente presenta la más baja energía libre de interacción) es el 458, como podemos verlo en la Figura 3.12a, mientras que para el caso de la Nicotiflorina el evento con máximo score fue el 009 (ver Figura 3.12b); para la Orientina, el 741 (ver Figura 3.12c); para la Vitexina, el 939 (ver Figura 3.12d); para la Apigetrina, el 197 (ver Figura 3.12e); y para el Cl-82198, el 135 (ver Figura 3.12f).

**Figura 3.12**

Conformación más probable como resultado del Docking.



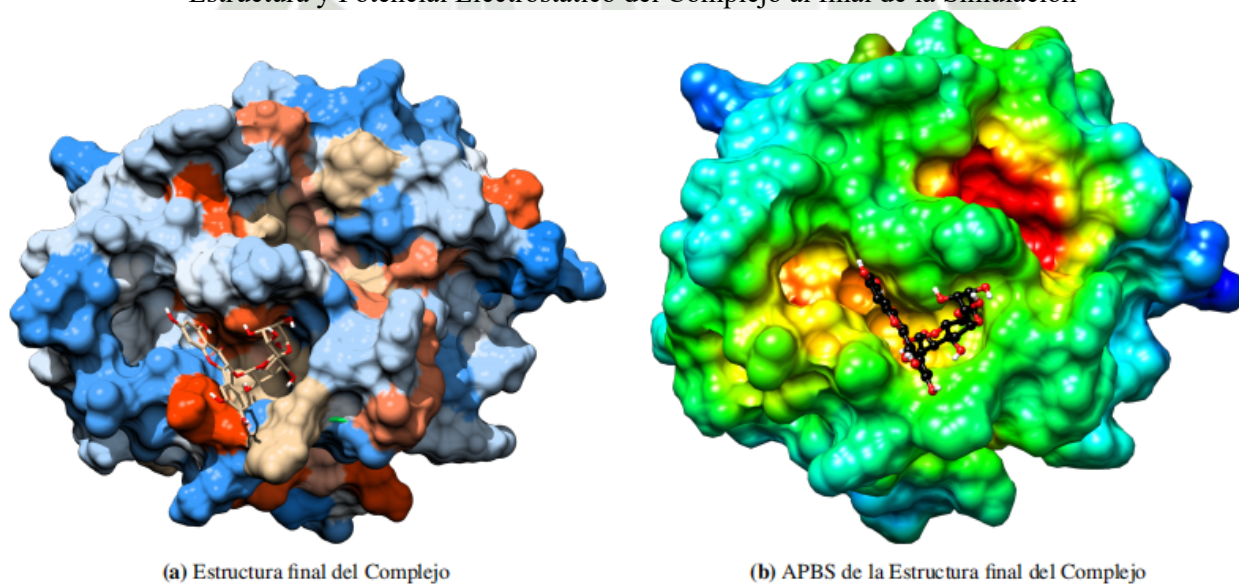
Fuente: Elaboración propia en UCSF Chimera.

Luego de elegir para cada caso el complejo adecuado, procedimos como en el caso de la proteína: cada uno de los complejos fueron solvatados, seguido de una neutralización y la correspondiente introducción de iones salinos a la concentración de 0.15M, seguidamente se procedió a la minimización de las fuerzas sobre el sistema, y la posterior introducción del termostato y barostato correspondientes (idénticos que para la proteína), la temperatura de referencia fue de 309.65K, la presión de 1.0Bars, para el caso del ensamble NVT se le dio una trayectoria de 10ns, mientras que para el ensamble NPT la trayectoria fue de 200ns.

Para el caso de la Rutina, la estructura final es presentada en la Figura 3.13a, donde podemos observar que el metabolito secundario se ha afianzado en la cavidad o bolsillo, esto se ve mas claramente en la superficie de potencial electrostático presentado en la Figura 3.13b, también podemos resaltar que el bolsillo de la región interactuante ha perdido su naturaleza negativa, como cuando no se encuentra el metabolito secundario en dicha región.

**Figura 3.13**

Estructura y Potencial Electrostático del Complejo al final de la Simulación

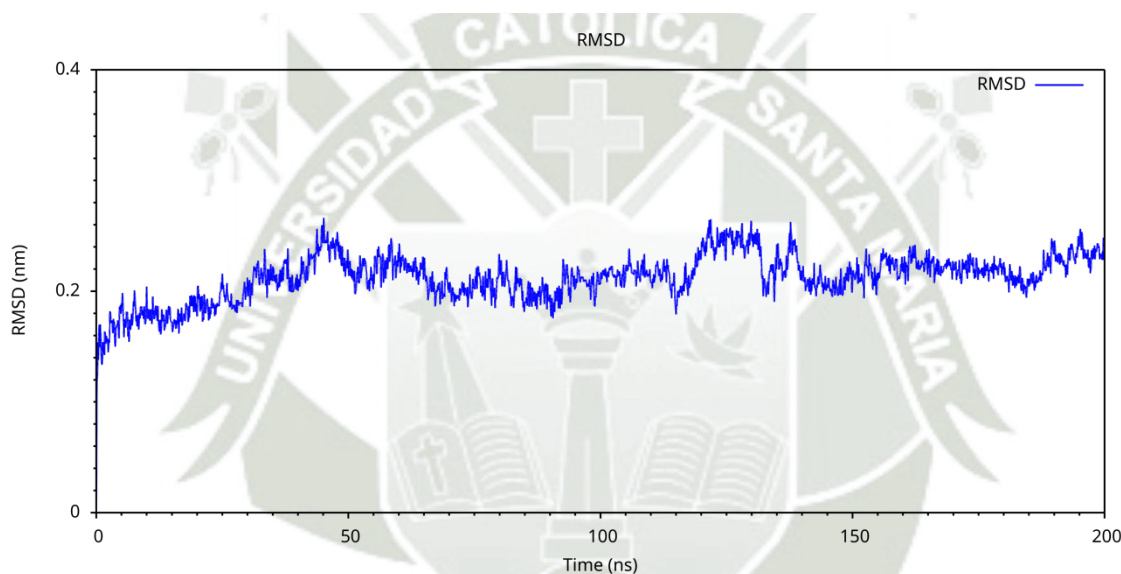


Fuente: Elaboración propia en UCSF Chimera.

Desde la Figura 3.14, donde presentamos el RMSD de la simulación de dinámica molecular para la interacción de la proteína y el metabolito secundario Rutina, podemos observar que nos hallamos en la zona de equilibrio, ya que la variación entre el pico máximo y el valle mínimo no supera 0.2nm, esto desde los 50ns aproximadamente. Adicionalmente podemos notar que entre los 120 a 145ns, podemos ver una movimiento asociado al posicionamiento en la cavidad de por parte de la Rutina.

**Figura 3.14**

Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Rutina

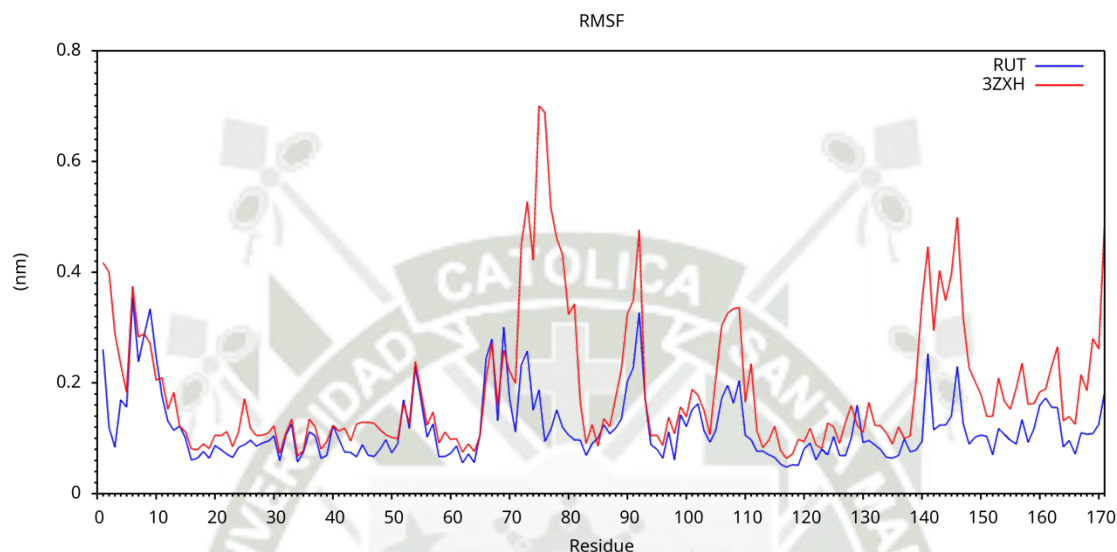


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

Cuando generamos la gráfica de las fluctuaciones por residuo, para todo el proceso de la simulación de dinámica molecular. En la Figura 3.15, podemos apreciar que la interacción entre la proteína y la Rutina, claramente esta interacción es del tipo estabilizante en la fluctuación.

**Figura 3.15**

Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Rutina



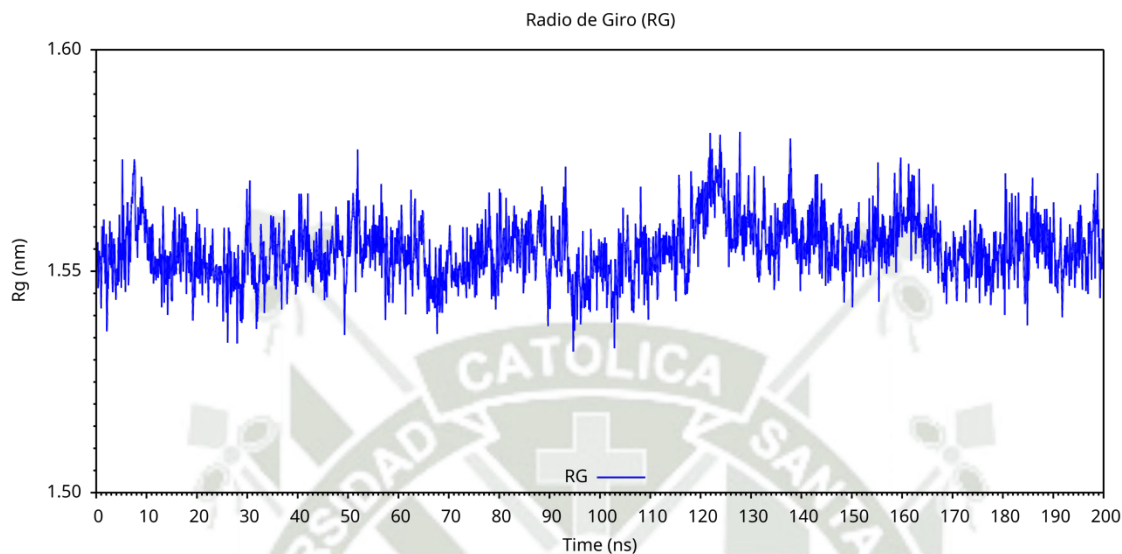
Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

La interacción con la rutina produjo una disminución en la fluctuación de los residuos comprendidos entre las posiciones 70 al 113 y 138 al 171, lo cual sugiere un efecto estabilizante local sobre la proteína.

Por otro lado, en la Figura 3.16 se muestra el comportamiento del radio de giro a lo largo de toda la simulación de dinámica molecular. Se observa un acomodamiento estructural reflejado en variaciones del radio de giro: en ciertas etapas de la trayectoria se presenta un ligero aumento, mientras que en otras se evidencia una disminución. Sin embargo, estas fluctuaciones permanecen dentro de un rango estable y no indican procesos de desnaturalización de la proteína.

**Figura 3.16**

Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Rutina.

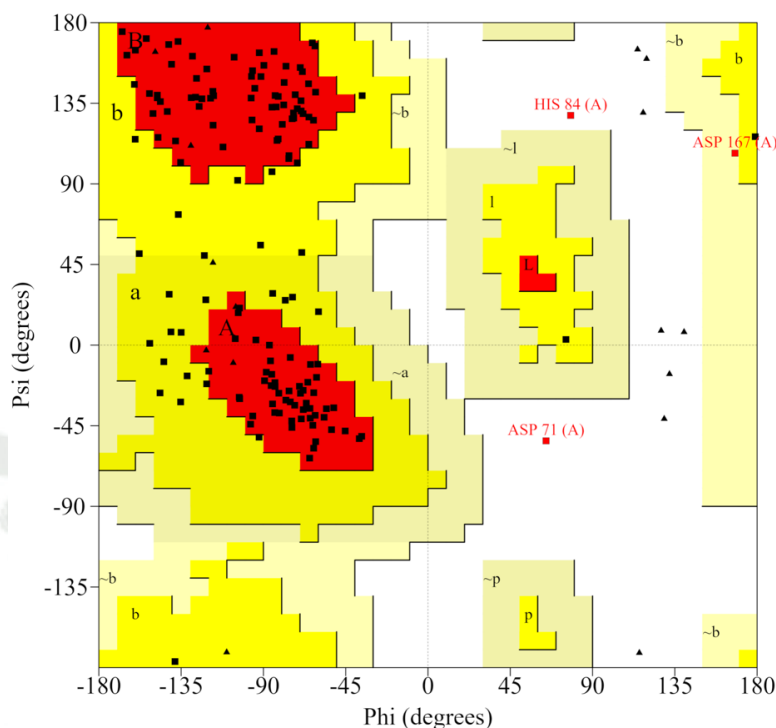


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

Por último para el caso de la Rutina, hemos generado el diagrama de Ramachandran (ver Figura 3.17), para el análisis como en el caso de la proteína sola, se han considerado solamente 140 residuos aminoacídicos, de los cuales 110 residuos se hallan en las regiones favorecidas lo que equivale al 78.6%, en las regiones permitidas se tiene un total de 27 residuos aminoacídicos lo que es equivalente al 19.3%, y un residuo en las regiones generosamente permitidos equivalente al 0.7%, haciendo un total de 98.6% mientras que tenemos dos residuos aminoacídicos que se hallan en las regiones no permitidas lo que equivale al 1.4%, haciendo un global de 100%. A pesar de la presencia de dos aminoácidos en las regiones no permitidas, la suma del porcentaje de los residuos en las zonas permitidas, favorecidas y generosamente favorecidas superan el mínimo empírico (95%) para considerar que dicha conformación existe en la naturaleza.

**Figura 3.17**

Gráfica del Diagrama de Ramachandran de la simulación de la DM cuando interactúa con la Rutina



Fuente: PDBsum a partir de la estructura generada.

Luego del análisis de la estabilidad estructural de nuestro complejo proteína – Rutina, procedimos a determinar la energía libre de interacción ( $\Delta G_{int}$ ) para este cálculo solamente utilizamos los datos de los últimos 50ns, para todos los casos.

Como podemos ver (Tabla 3.2) la energía libre de interacción para la Rutina es de  $-318.869 \pm 33.779$  kJ/mol, y al descomponer las contribuciones a la energía observamos que los que más contribuyen son las interacciones son el componente de Van der Waals y SAV (Volumen Accesible al Solvente).

En el caso de la Apigetrina, el RMSD se muestra en la Figura 3.18 de la simulación de dinámica molecular para el complejo proteína-ligando, se puede observar que el sistema abarca una zona de equilibrio a partir de los 70ns aproximadamente, ya que la variación entre los picos máximos y los valles mínimos no supera a los 0.2 nm de promedio. Este comportamiento sugiere una estabilización estructural tras una fase inicial de acomodación que se extiende hasta los 70 ns. Asimismo, es posible notar una ligera fluctuación entre los 110 a los 145 ns, lo que podría estar

relacionado con reacomodamientos del ligando dentro del sitio de unión, por ello no compromete la estabilidad general del complejo.

**Tabla 3.2**

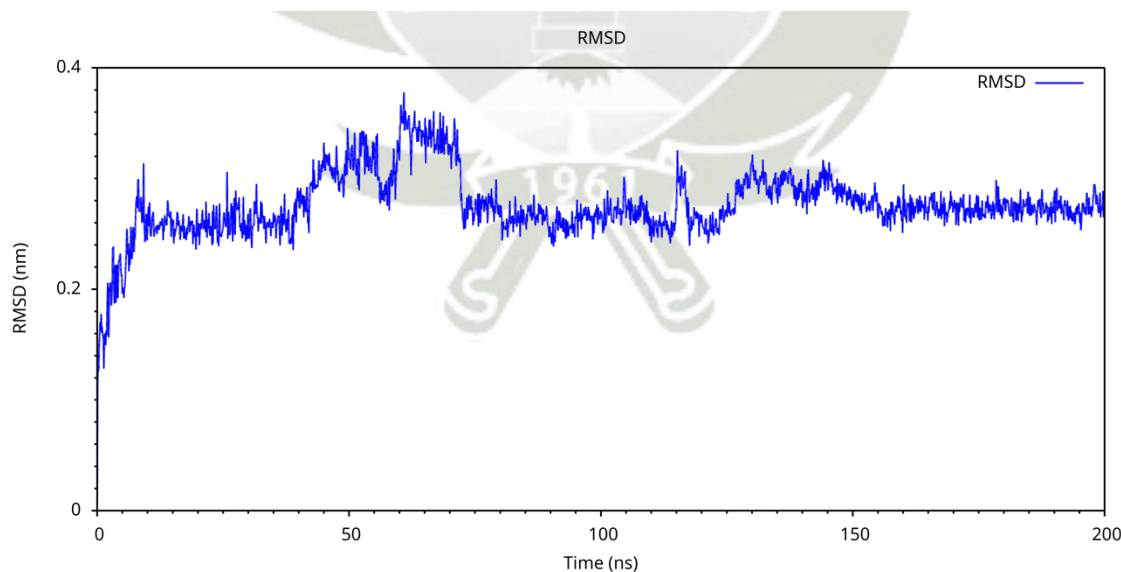
Resultados para el calculo de la Energía libre de Interacción de la Rutina.

Componente	Energía (kJ/mol)
Energía de Van der Waals	-185.540 ± 15.493
Energía electrostática	-9.496 ± 13.381
Energía de solvatación polar	70.435 ± 13.376
Energía SASA	-19.641 ± 1.147
Energía SAV	-174.626 ± 22.626
Energía WCA	0.000 ± 0.000
Energía libre de unión	-318.869 ± 33.779

Fuente: Elaboración propia a partir del mmpbsa.

**Figura 3.18**

Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Apigetrina

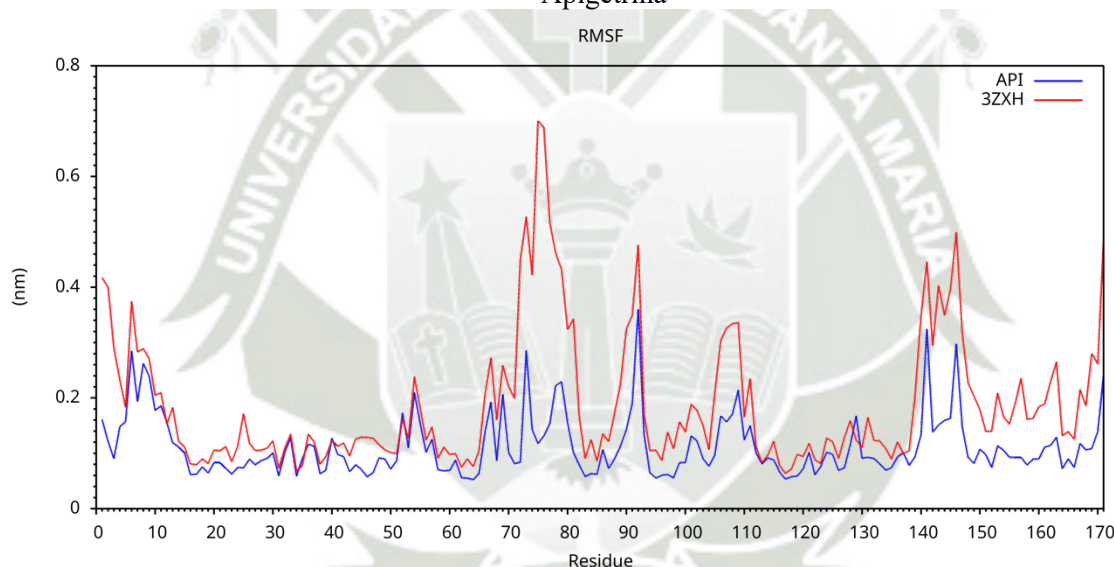


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

En la Figura 3.19, presentamos al análisis de RMSF por residuo cuando interactúa con la Apigetrina comparado a la proteína en su estado libre. Se observa que, en la presencia del ligando, la proteína muestra una reducción de la flexibilidad en varias regiones, especialmente entre los residuos 65 al 115 y del 138 al 171, en comparación con el ligando. Este patrón sugiere que la Apigetrina genera una estabilización local al unirse al sitio activo. Este tipo de interacción es indicativo de un acoplamiento específico y estable entre el metabolito y el sitio de unión protéico. Esto podría estar ligado a la naturaleza de la interacción, fundamentalmente en la cavidad de unión, zona de la proteína que esta relacionada con el sitio activo.

**Figura 3.19**

Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Apigetrina



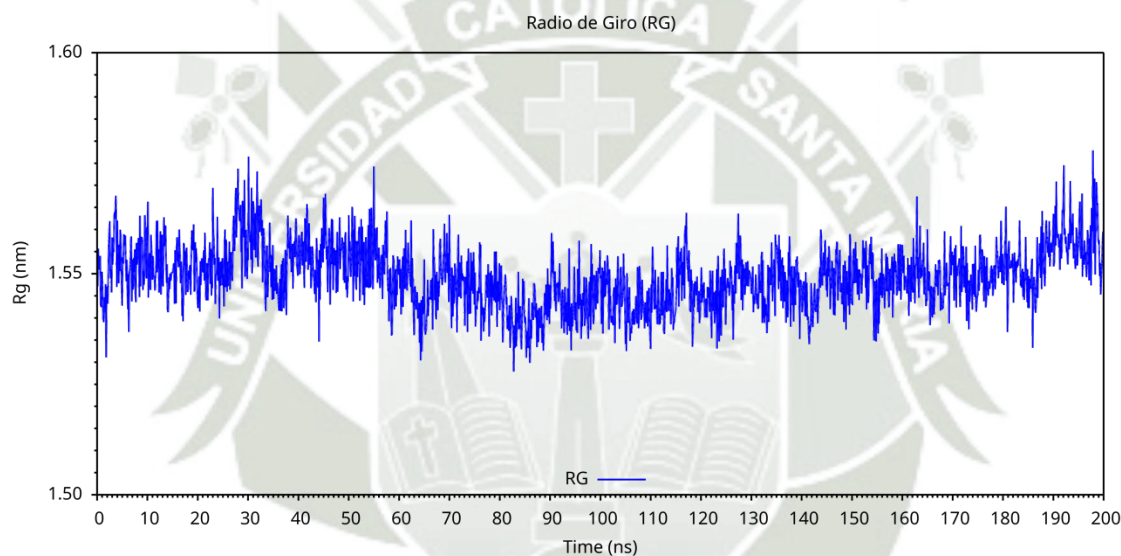
Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

Asimismo, en la Figura 3.20, presentamos la gráfica del Radio de Giro (Rg) para toda la trayectoria de la simulación de dinámica molecular. Apreciamos que existen reacomodamientos conformacionales a lo largo de la trayectoria, inicialmente el sistema se expande en una ligera región de los 0 a 5ns, luego de lo cual se estabiliza, pero entre los 25 a 35ns encontramos un fuerte cambio conformacional, que posteriormente tiende a estabilizar el sistema, con una pequeña meseta para posteriormente compactarse hasta los 90ns, luego de cual la proteína muestra una ligera descompactación hasta los 190ns, luego de lo cual casi al final de la simulación molecular presenta

una pérdida de compactación. En general podemos decir que estas oscilaciones, aunque presentes en distintas regiones de la simulación, se mantienen dentro de un rango estrecho y no presentan cambios estructurales significativos. En consecuencia, no se observan indicios de desnaturalización ni colapso estructural de la proteína. Por el contrario, el comportamiento general del Rg sugiere que la proteína mantiene su compactación global durante toda la simulación, incluso en presencia del ligando Apigetrina, lo cual refuerza la hipótesis de una interacción estable sin pérdida del orden estructura.

**Figura 3.20**

Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Apigetrina.



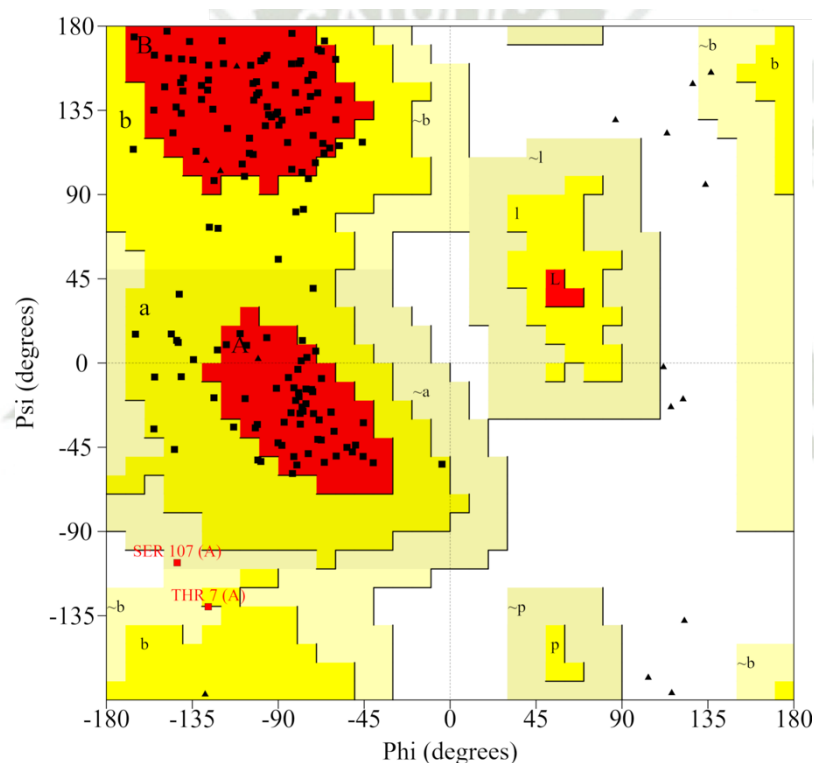
Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

Por último, para analizar la influencia de la presencia del metabolito secundario Apigetrina sobre la estructura de la proteína, se generó el diagrama de Ramachandran (ver Figura 3.21) para considerar a los residuos aminoacídicos, con un total de 171. De estos, 112 residuos (75%) se encuentran en regiones favorecidas, 26 residuos (18.6%) en regiones permitidas, y 2 residuos (1.4%) en regiones generosamente permitidas, sumando así un total de 100% de los residuos dentro de las formas conformacionalmente aceptables. La alta proporción de residuos ubicados en regiones favorecidas y permitidas indica que la estructura del complejo es conformacionalmente estable y puede estar presente en condiciones naturales. A pesar de que visualmente se identifican

a SER-107 y THR-7 fuera de las regiones permitidas, estos no afectan la validez estructural global. Pueden encontrarse ambos en regiones estructuralmente flexibles, que por su naturaleza, presentan mayor grados de libertad conformacional. Es importante recordar, que cuando hablamos de grados de libertad conformacional, esto esta asociado a que un grupo o fracción de el residuo presenta un enlace simple que permite giros en  $360^\circ$ , a lo que podemos asociar como una región en la que los efectos estéricos son predominantes.

**Figura 3.21**

Gráfica del Diagrama de Ramachandran de la simulación de la DM cuando interactúa con la Apigetrina.



Fuente: PDBsum a partir de la estructura generada.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis energético mediante el método MMPBSA para evaluar la estabilidad del complejo (ver Tabla 3.3). El valor promedio de energía libre de unión fue de  $-224.204 \pm 31.577$  kJ/mol, lo que indica que la interacción entre el ligando y la proteína es termodinámicamente favorable. Al descomponer las contribuciones energéticas, se observa que las interacciones de van der Waals representan el  $-142.225 \pm 15.464$  kJ/mol, esto sugiere que las

interacciones hidrofóbicas y de proximidad molecular junto con el volumen de la cavidad accesible al solvente, son el principal factor estabilizante en la formación del complejo. Por otro lado, la contribución de la energía de solvatación polar fue de  $83.626 \pm 19.115$  kJ/mol, lo que refleja una penalización energética al desplazar el agua del entorno polar durante la unión del ligando. La energía de SAV ( $-132.924 \pm 24.003$  kJ/mol) también contribuye significativamente a la estabilidad del complejo, mientras que la energía de WCA fue nula, lo cual indica que no aportó contribución. En base a este resultado podemos indicar que existe una afinidad y estabilidad en el complejo proteína–Apigetrina.

**Tabla 3.3**

Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Apigetrina.

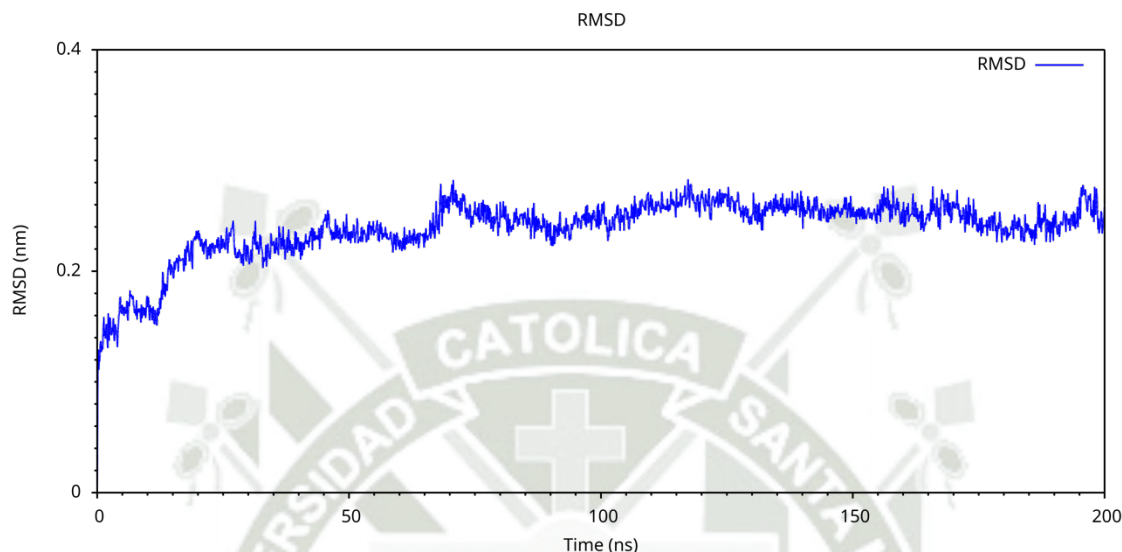
<b>Componente</b>	<b>Energía (kJ/mol)</b>
Energía de Van der Waals	$-142.225 \pm 15.464$
Energía electrostática	$-16.614 \pm 9.765$
Energía de solvatación polar	$83.626 \pm 19.115$
Energía SASA	$-16.067 \pm 1.509$
Energía SAV	$-132.924 \pm 24.003$
Energía WCA	$0.000 \pm 0.000$
Energía libre de unión	$-224.204 \pm 31.577$

Fuente: Elaboración propia a partir del mmpbsa.

En el caso de la Vitexina, la estabilidad RMSD en un periodo de 200ns sus valores oscilaron entre 0.1 y 0.4nm (ver Figura 3.22). En la fase inicial de la simulación hasta los 20ns se observa un crecimiento progresivo, característico del proceso de adaptación. Posteriormente, desde los 20ns el RMSD se mantuvo relativamente estable, sin evidenciar desviaciones significativas. Esto sugiere que la Vitexina presenta una conformación estable dentro del entorno simulado.

**Figura 3.22**

Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Vitexina.

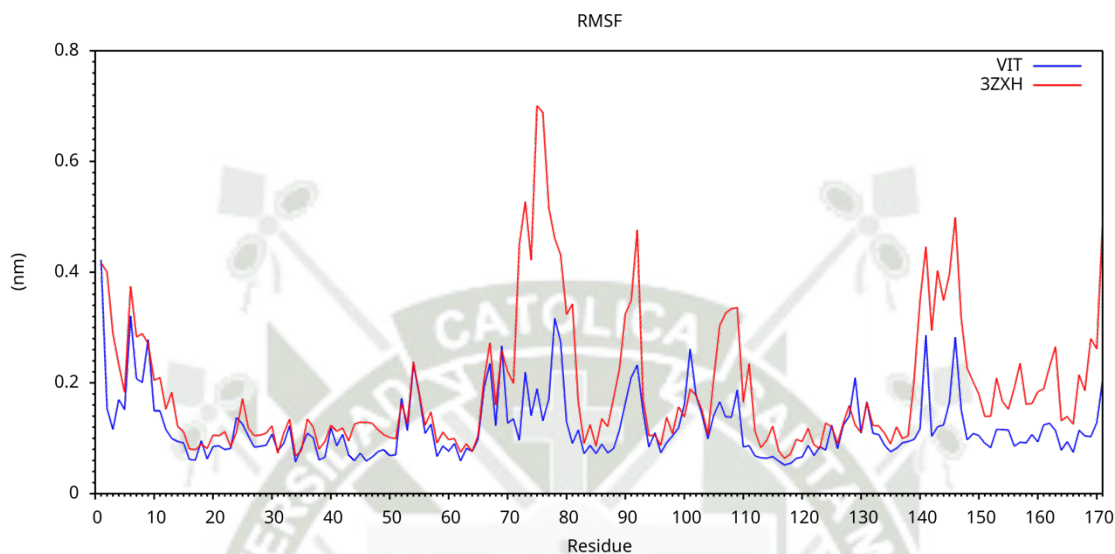


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

En el análisis del RMSF (ver Figura 3.23), podemos apreciar que la interacción con la Vitexina produce en general una estabilización o anclaje de nuestra proteína, disminuyendo las fluctuaciones en diversas regiones de la proteína, esto es razonable y esta dentro de un comportamiento normal. Sin embargo, varias zonas, como en los residuos 65 al 115 y del 135 al 171, la proteína sola mostró mayor movimiento, a comparación de la proteína unida a la Vitexina. Esto nos indica que la proteína se vuelve más estable en algunas regiones ya que sus residuos tienden a presentar un menor movimiento vibracional. Puede que la Vitexina tenga un efecto estabilizador sobre la proteína. Entonces, podríamos decir que la interacción es efectiva entre ambos (proteína–ligando).

**Figura 3.23**

Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Vitexina.

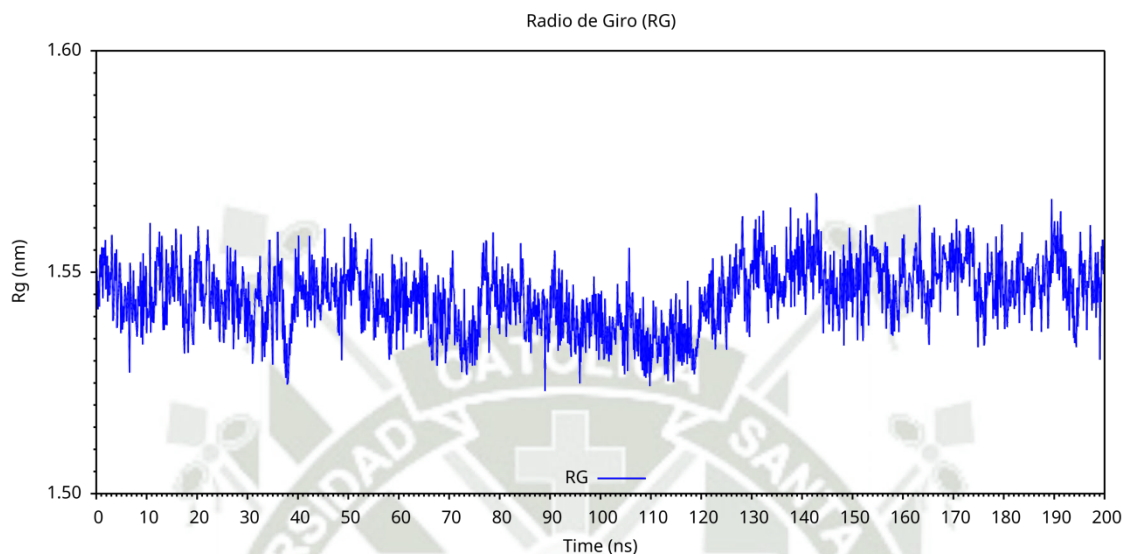


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

En la figura del Radio de Giro (ver Figura 3.24) de la simulación de dinámica molecular, podemos encontrar que fluctúa entre los valores de 1.52 y 1.58nm, se observan pequeñas fluctuaciones, pero aún así, el perfil general es relativamente estable, sin aumentos o disminuciones abruptas. Por otro lado, podemos observar que desde los 130ns, nuestra proteína ya no sufre mayor compactación hasta el final de la simulación de dinámica molecular. Entonces, podemos decir que la proteína conserva su compacidad estructural durante toda la simulación, lo cual es un buen inicio de estabilidad global del sistema al permanecer estable el complejo.

**Figura 3.24**

Gráfica de Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Vitexina.



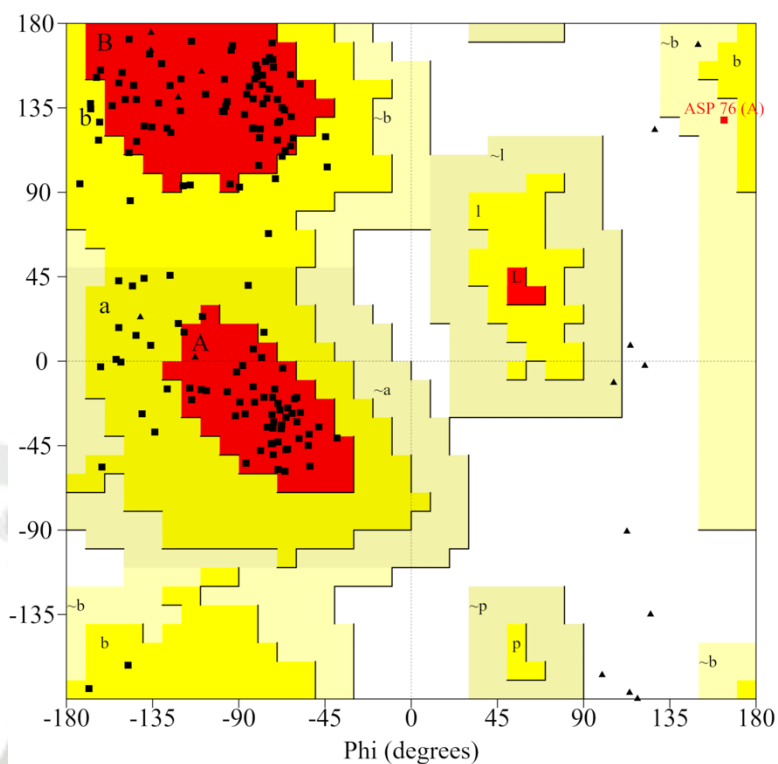
Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

En la Figura 3.25 se muestra la gráfica de Ramachandran con un total de 171 residuos totales, se observa que 109 residuos (77.9%) se encuentran en las regiones más favorecidas; 30 residuos (21.4%) están en regiones adicionalmente permitidas, y 1 residuo 0.7% se ubica en la región generosamente permitida. Además, ningún residuo (0.0%) se encuentran en regiones no permitidas, lo cual es un buen indicio de validez.

En el análisis del MMPBSA que se muestra en la Tabla 3.4, el valor de la energía libre de interacción fue de  $-252.608 \pm 32.282$  indicando que la unión de la proteína con la vitexina es termodinámicamente favorable. Entonces se sugiere una fuerte afinidad entre ambas moléculas, siendo las interacciones hidrofóbicas (Van der Waals y Volumen Accesible al Solvente) las principales responsables de la estabilización del complejo, mientras que la energía libre debido a la solvatación polar, es desestabilizante, pero menor en relación a los dos ligandos anteriores.

**Figura 3.25**

Gráfica del Diagrama de Ramachandran de la simulación de la DM cuando interactúa con la Vitexina.



Fuente: PDBsum a partir de la estructura generada.

**Tabla 3.4**

Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Vitexina.

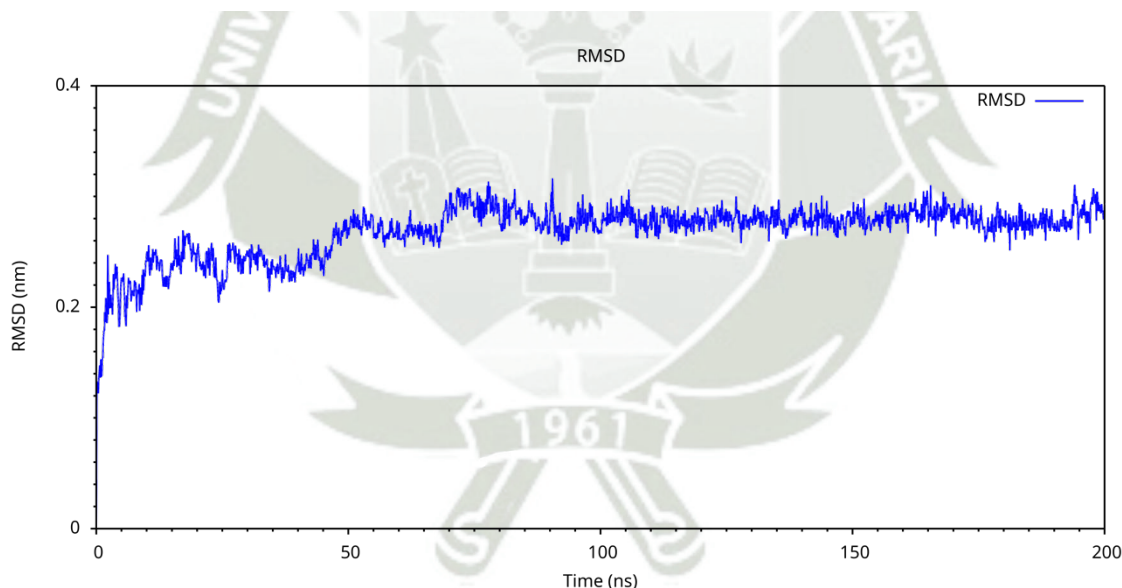
Componente	Energía (kJ/mol)
Energía de Van der Waals	-144.728 ± 16.022
Energía electrostática	-13.974 ± 11.761
Energía de solvatación polar	54.202 ± 16.337
Energía SASA	-15.615 ± 1.363
Energía SAV	-132.494 ± 21.368
Energía WCA	0.000 ± 0.000
Energía libre de unión	-252.608 ± 32.282

Fuente: Elaboración propia a partir del mmpbsa.

En el análisis de los resultados de la trayectoria para la Orientina, se observa en la Figura 3.26 un incremento progresivo del RMSD debido a su acomodación inicial de la proteína en la dinámica, luego alcanza una estabilización a partir de los 70 ns que es estabilizada en torno a los 0.3nm, con ligeras fluctuaciones. De igual forma, el sistema alcanza un estado conformacional estable o también denominado región de equilibrio. Esto quiere decir, la proteína y la orientina mantienen su integridad estructural a lo largo del tiempo durante el proceso de simulación de dinámica molecular. En el caso de este ligando, podemos observar que la fluctuación del RMSD es pequeña y se llega rápidamente a la región de equilibrio, lo que en realidad nos habla de la naturaleza de la interacción, que debe estar fuertemente relacionada a un procesos de estabilización.

**Figura 3.26**

Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Orientina.



Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

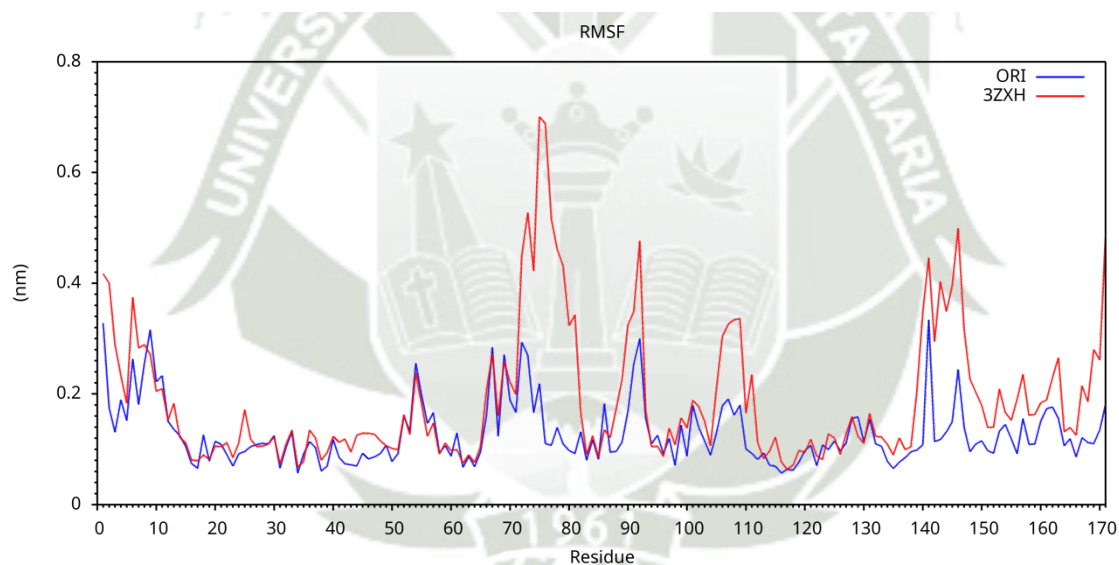
En el RMSF (ver Figura 3.27) se evidencia que la unión de la orientina genera en la proteína una estabilización estructural localizada en las zonas específicas de los 70 a los 115 y de los 135 a los 171 residuos, donde las diferencias con la proteína libre son más evidentes.

Esto indica que la unión de la proteína con la orientina genera estabilidad estructural localizada en zonas específicas de la proteína. Los valores más elevados del RMSF sugieren mayor flexibilidad o desorden estructural en ausencia del ligando.

En el Radio de Giro (ver Figura 3.28) se observa que, tras una ligera fluctuación en los primeros 55ns, el valor del complejo se mantiene relativamente estable al rededor de los 1.55nm. Esta estabilidad sugiere que el sistema no presenta cambios estructurales significativos a lo largo de la simulación de dinámica molecular, conservando una conformación compacta.

**Figura 3.27**

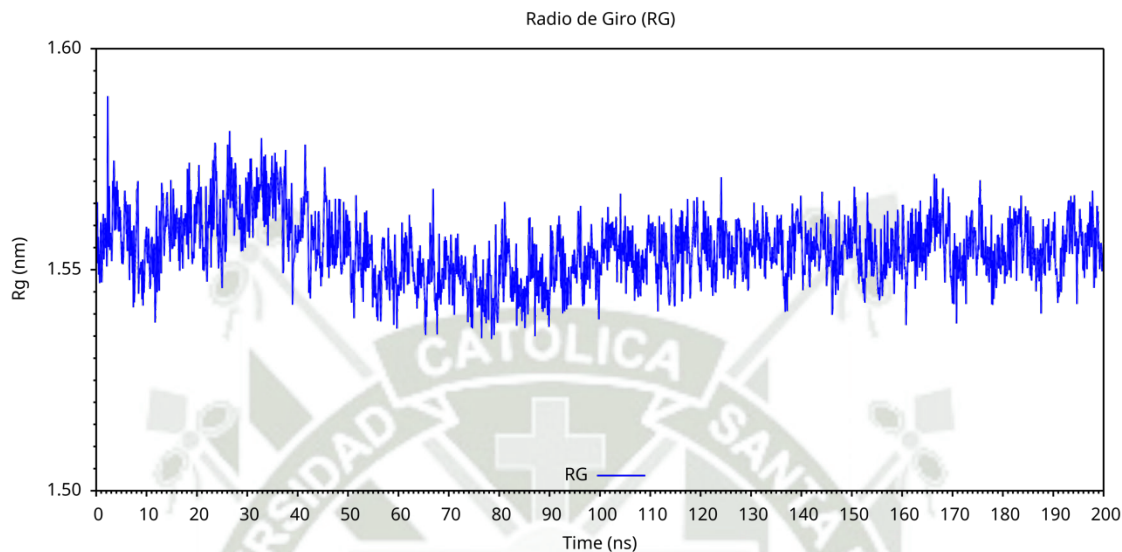
Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Orientina.



Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

**Figura 3.28**

Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Orientina.



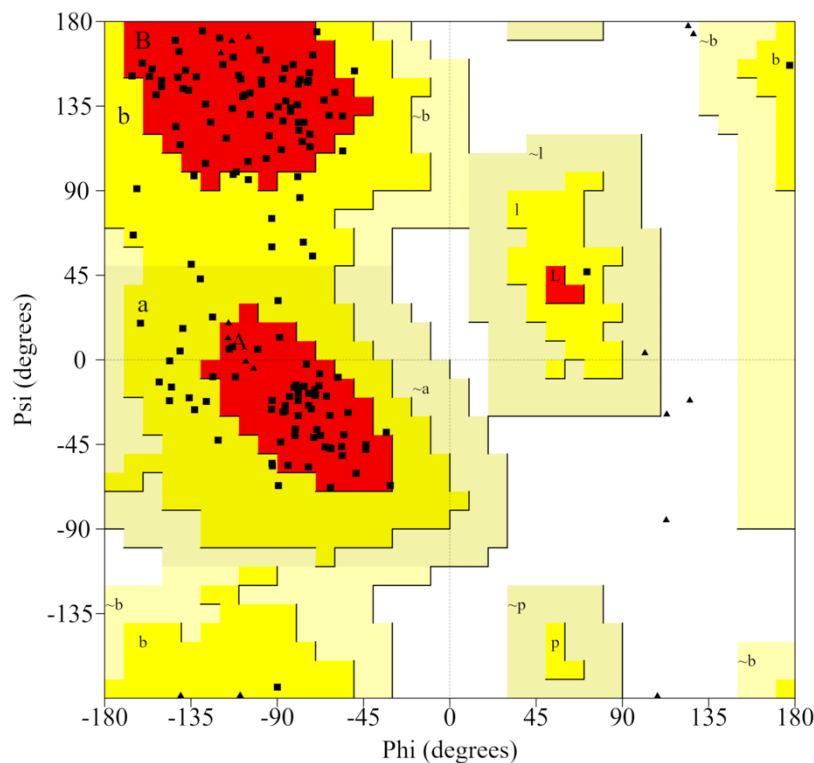
Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

Esta estabilidad sugiere que el sistema no presenta cambios estructurales significativos a lo largo de la simulación de dinámica molecular, conservando una conformación compacta.

Los 171 residuos fueron analizados mediante el Diagrama de Ramachandran (ver Figura 3.29). De los cuales el resultado fue que 107 residuos (76.4%) se encuentran en las regiones más favorecidas; 33 residuos (23.6%) se localizan en las regiones adicionalmente permitidas. No se observaron residuos en regiones generosamente permitidas ni en regiones no permitidas, lo que indica una buena calidad conformacional del modelo.

Figura 3.29

Gráfica del Diagrama de Ramachandran para la proteína al final de la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Orientina.



Fuente: PDBsum a partir de la estructura generada.

En el análisis de MMPBSA la energía libre de unión alcanza un valor de  $-256.268 \pm 25.676$  que indican que hay una unión favorable entre la proteína y el ligando. En términos de componentes energéticos, las contribuciones más significativas a la estabilización del complejo provienen de la energía de Van der Waals, la energía debido al volumen accesible al solvente y la energía electrostática, es importante resaltar que la contribución energética debido a la solvatación polar se ha incrementado ostensiblemente. Estas uniones no covalentes son fundamentales para mantener la afinidad proteína–ligando. Entonces, podríamos decir que existe una interacción favorable entre ambos (ver Tabla 3.5).

**Tabla 3.5**

Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Orientina.

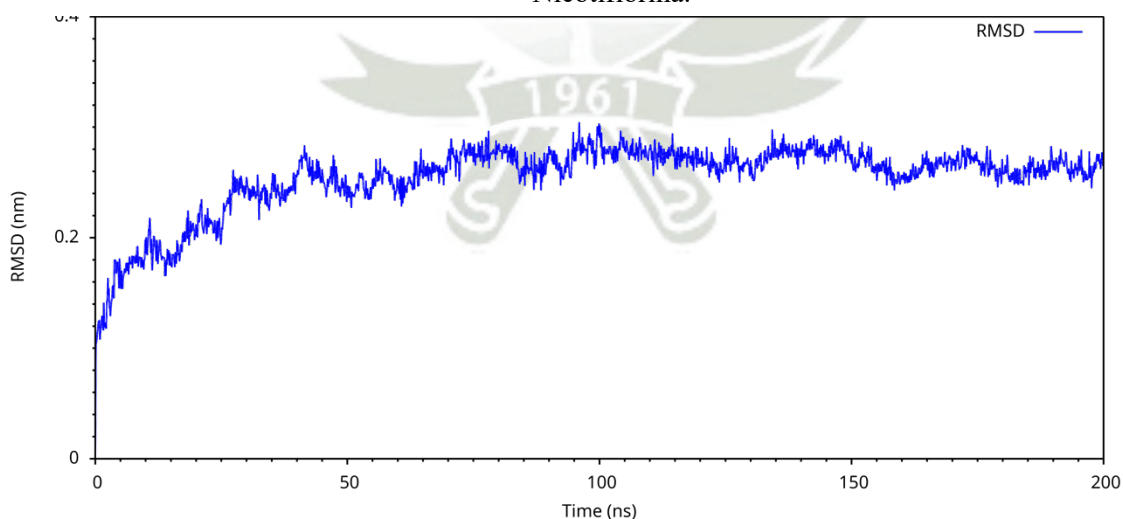
<b>Componente</b>	<b>Energía (kJ/mol)</b>
Energía de Van der Waals	-138.771± 7.851
Energía electrostática	-44.140 ± 14.284
Energía de solvatación polar	71.784 ± 12.807
Energía SASA	-15.291 ± 0.893
Energía SAV	-129.849 ± 17.468
Energía WCA	0.000 ± 0.000
Energía libre de unión	-256.268 ± 25.676

Fuente: Elaboración propia a partir del mmpbsa.

En el caso de la Nicotiflorina, el RMSD (ver Figura 3.30) presenta un incremento en los primeros 35ns, luego llega a una estabilización que oscila en un rango promedio del 0.25 al 0.30nm, manteniéndose relativamente constante hasta el final de la simulación. Entonces, la simulación de dinámica molecular alcanzó una conformación estable sin presentar cambios drásticos.

**Figura 3.30**

Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Nicotiflorina.

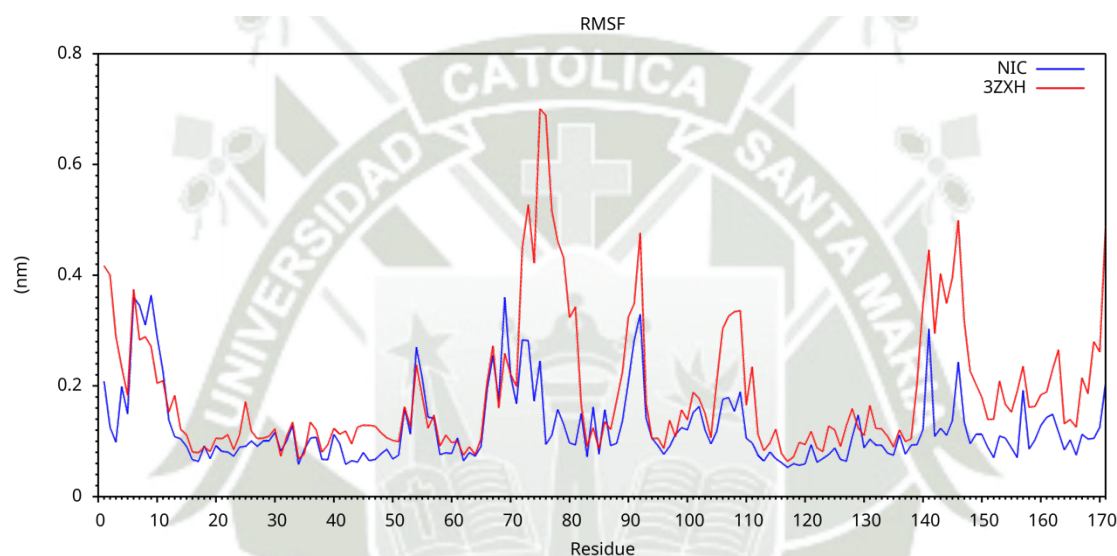


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

En el RMSF (ver Figura 3.31) podemos observar que los residuos que comprenden una región entre 70 al 113 y del 135 al 171, presentan fluctuaciones más altas en forma libre (sólo proteína) que con el complejo, lo que sugiere que la unión de la Nicotiflorina estabiliza estas regiones. Se respalda la estabilidad obtenida en el RMSD.

**Figura 3.31**

Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de dinámica molecular cuando interactúa con la Nicotiflorina.



Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

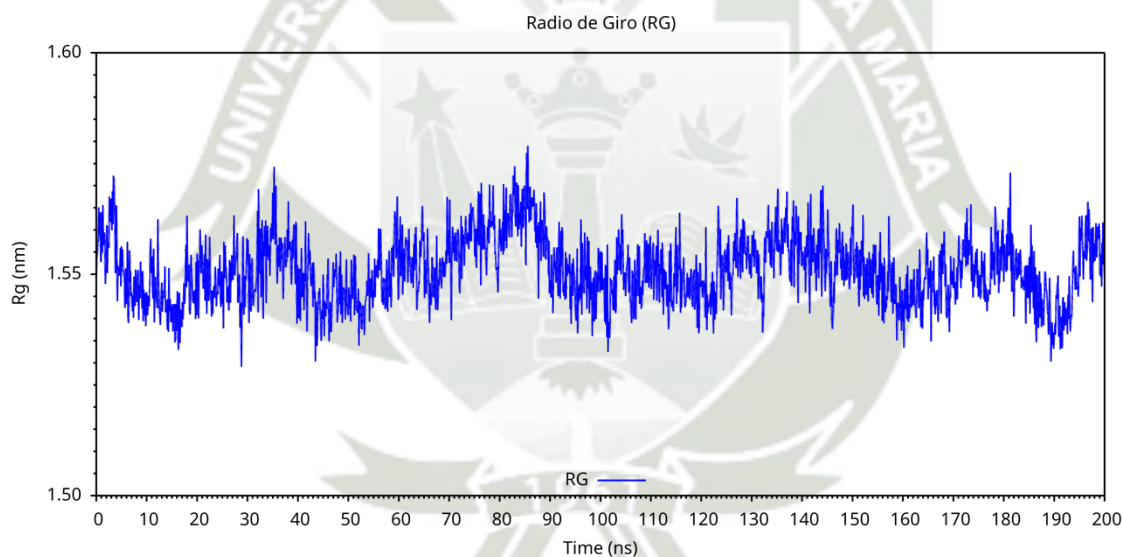
El Radio de Giro (ver Figura 3.32) oscila entre los valores 1.53 y 1.58nm, con ligeras fluctuaciones en toda la simulación. El comportamiento relativamente constante sugiere que la proteína mantiene una conformación globalmente compacta y no experimenta procesos significativos de expansión o colapso estructural en la simulación. Pero a la vez, nos indica que al estar interactuando con la Nicotiflorina, la proteína está en procesos de compactación y descompactación durante toda la simulación de dinámica molecular. Esto desde aproximadamente los 85ns luego de lo cual solo apreciamos fluctuaciones constantes.

El diagrama de Ramachandran (ver Figura 3.33) nos permite evaluar de forma observacional la relación entre los ángulos  $\Phi$ (Phi) y  $\Psi$ (Psi) de los aminoácidos, los cuales se hallan representados

en forma de triángulos y cuadrados negros. Entonces, nos muestra que 116 residuos se encuentran en las regiones más favorecidas (82.9%); que 23 residuos (16.4%) se encuentran en las regiones adicionalmente permitidas y que un residuo (0.7%) se encuentra en las regiones generosamente permitidas. No se observan residuos en las regiones no permitidas, lo que indica una buena capacidad conformacional del modelo. Cumpliendo la calidad estructural. De los 171 residuos evaluados, todos se hallan en las regiones permitidas y favorecidas, excepto la Gln-157, pero se pinta de rojo por que se halla en la región generosamente favorecida, lo que no genera un inconveniente en definir a la proteína como de ocurrencia natural en esta conformación.

**Figura 3.32**

Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la Nicotiflorina.

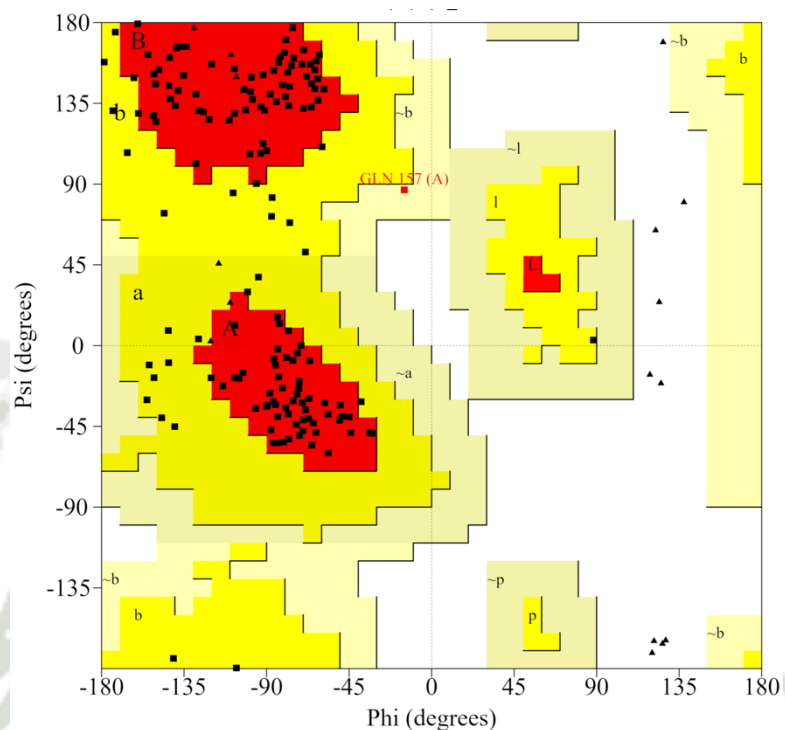


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

Mediante el método de MMP/BSA se calculó la energía total de unión que fue de  $-349.348 \pm 29.041$  kJ/mol, lo que indica la interacción altamente favorable y estable entre la Nicotiflorina y la proteína (ver Tabla 3.6).

**Figura 3.33**

Gráfica del Diagrama de Ramachandran para la proteína al final de la simulación de la dinámica molecular cuando interactúa con la Nicotiflorina.



Fuente: PDBsum a partir de la estructura generada.

Como en los casos anteriores, son las contribuciones energéticas de Van der Waals y del Volumen Accesible para el Solvente mientras que la contribución de solvatación polar es desfavorable para la interacción en la cavidad.

En el caso del CL-82198, este es el compuesto sintético de mayor afinidad, viendo la gráfica de RMSD (ver Figura 3.34) a lo largo de 200ns. Se observa un incremento inicial en los primeros 30ns que corresponde al proceso de adaptación conformacional del compuesto en la simulación.

Posteriormente, entre los 50 y 115ns, el RMSD se mantiene relativamente estable, fluctuando entre 0.15 y 0.35nm, lo que indica una conformación estable. Sin embargo, al final de la simulación (120 y 150ns), se observa un leve incremento en la gráfica, aunque permanece dentro del rango normal aceptable ( $\pm 0.2$ nm), lo que aún sugiere que el compuesto conserva su integridad estructural general

durante toda la simulación, y esta pequeña fluctuación puede estar asociada con un reacomodo del ligando sobre la superficie de la proteína.

**Tabla 3.6**

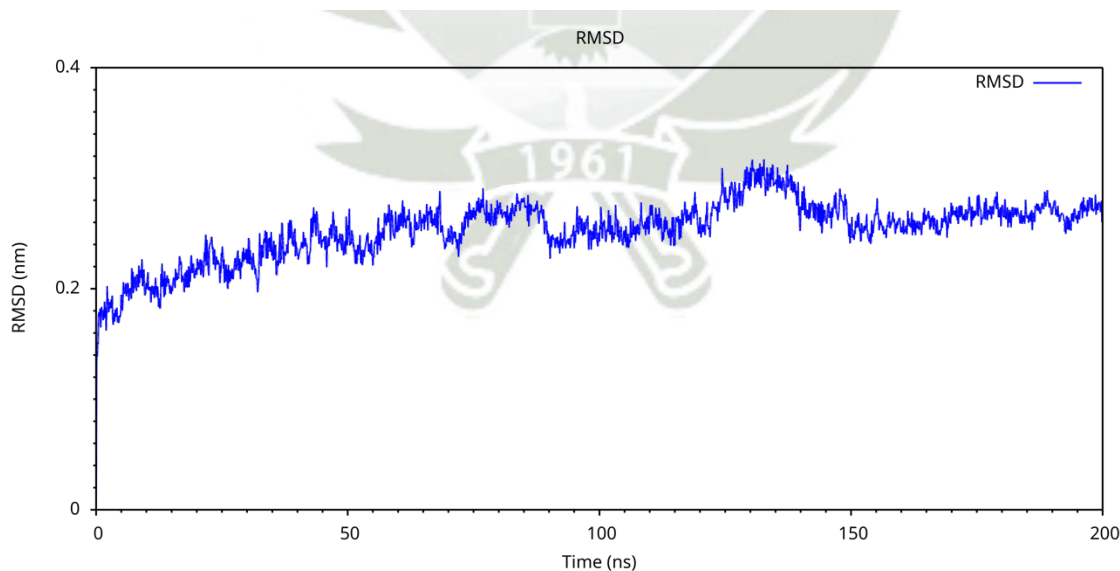
Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la Nicotiflorina.

Componente	Energía (kJ/mol)
Energía de Van der Waals	-195.016 ± 16.048
Energía electrostática	-23.184 ± 16.423
Energía de solvatación polar	62.054 ± 13.573
Energía SASA	-19.352 ± 1.116
Energía SAV	-173.849 ± 20.523
Energía WCA	0.000 ± 0.000
Energía libre de unión	-349.348 ± 29.041

Fuente: Elaboración propia a partir del mmpbsa.

**Figura 3.34**

Gráfica del RMSD para la proteína durante la simulación de la dinámica molecular cuando interactúa con la CL-82198.

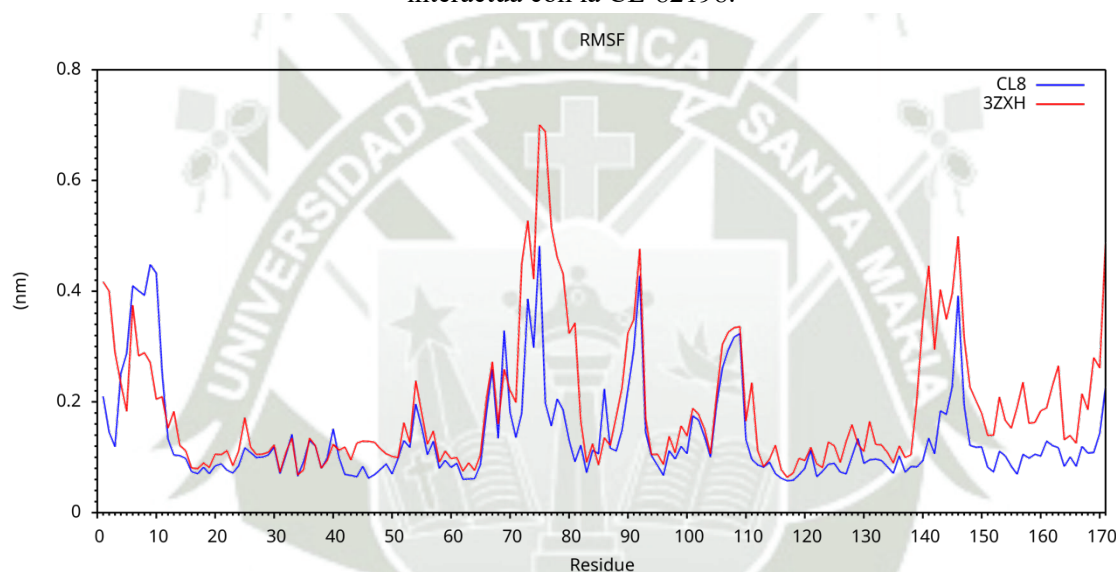


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

En el RMSF (ver Figura 3.35) se puede evaluar la flexibilidad local de los residuos de la proteína cuando el compuesto sintético CL-82198 interactúa en la cavidad proteica. Ambas estructuras presentan un patrón de fluctuación similar, con variaciones mayores en las regiones 73 al 83 y del 137 al 171 residuos, indica residuos altos de la proteína que se asemejan a los picos del ligando, lo que indica que hay una disminución de la fluctuación residual inducida por el ligando que actúa como estabilizador.

**Figura 3.35**

Gráfica del RMSF para la proteína durante la simulación de la dinámica molecular cuando interactúa con la CL-82198.



Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

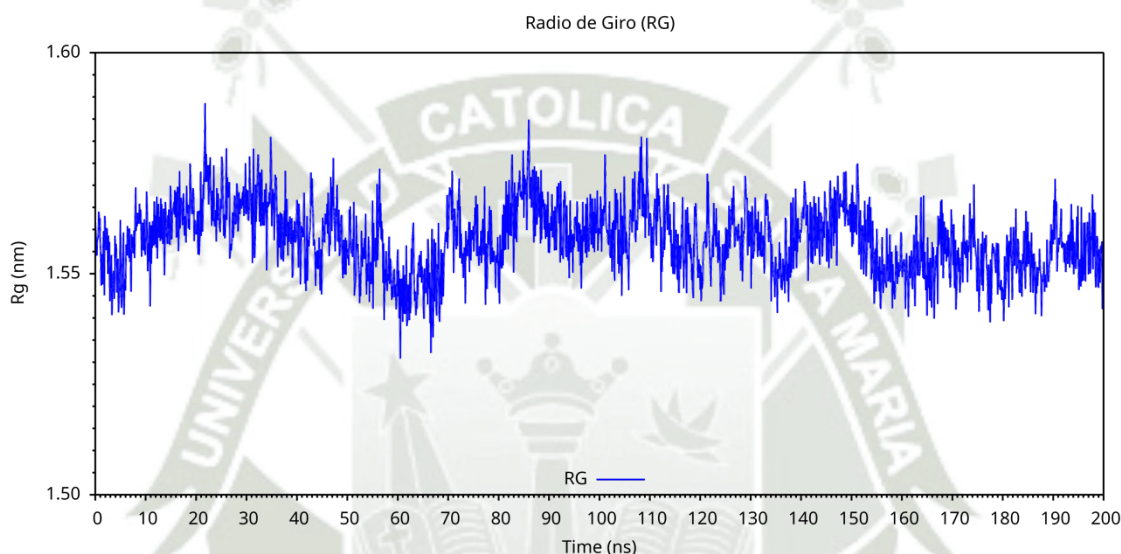
En el Radio de Giro (ver Figura 3.36) se observa que la compactación del complejo oscila entre aproximadamente 1.53 y 1.59nm, con pequeñas fluctuaciones naturales, lo que indica que la proteína mantiene una estructura global estable y compacta en presencia del ligando. No se compromete la integridad estructural.

En el Diagrama de Ramachandran que presentamos en la Figura 3.37, nos muestra la estadística del gráfico; 117 residuos (83.6%) se encuentran en las regiones favorecidas; 23 residuos lo que equivale al 16.4% se hallan en las regiones permitidas y 0 residuos(0.0%), en las regiones generosamente permitidas, mientras que ningún residuo se halla en las regiones prohibidas. Lo que

nos da un total del 100.0% de los residuos, entonces la estructura es conformacionalmente válida y estereo electrónicamente coherente. Esto nos habla de que las interacciones del CL-82198 con la proteína, son de naturaleza estabilizante y que esta estructura presenta una gran probabilidad de existir en forma natural.

**Figura 3.36**

Gráfica del Radio de Giro para la proteína durante la simulación de la DM cuando interactúa con la CL-82198

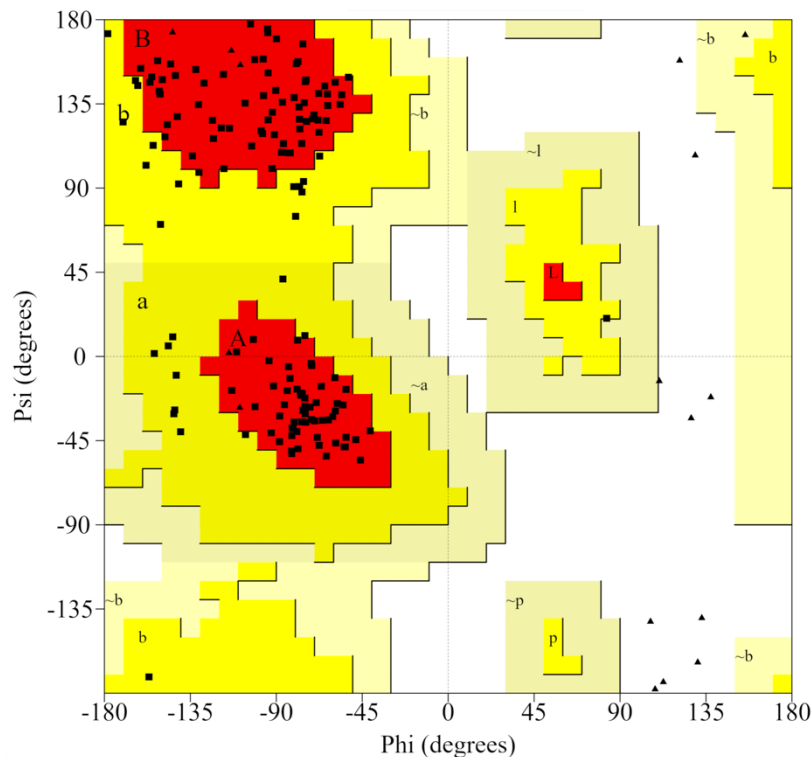


Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

En el Tabla 3.7 se muestran los resultados del análisis mediante la aproximación MMPBSA, brindándonos el valor para la energía libre de interacción de  $-340.569 \pm 25.390$  kJ/mol, lo que indica que hay una interacción altamente favorable entre el ligando y el receptor. Por lo que esto nos sugiere una fuerte afinidad entre el ligando y la proteína. Asimismo, se puede también observar que las interacciones no covalentes (Van der Waals y electrostáticas) dominan la estabilización del complejo proteína–ligando, pero es importante resaltar que al igual que en los casos anteriores, la contribución a la energía por parte de la solvatación polar es desfavorable, lo que nos hace presumir que en la cavidad donde se realiza la interacción proteína–ligando, el acceso de moléculas de solvente son poco probables.

**Figura 3.37**

Gráfica del Diagrama de Ramachandran para la proteína al final de la simulación de la dinámica molecular cuando interactúa con la CL-82198.



Fuente: PDBsum a partir de la estructura generada.

**Tabla 3.7**

Resultados para el cálculo de la Energía libre de Interacción de la CL-82198.

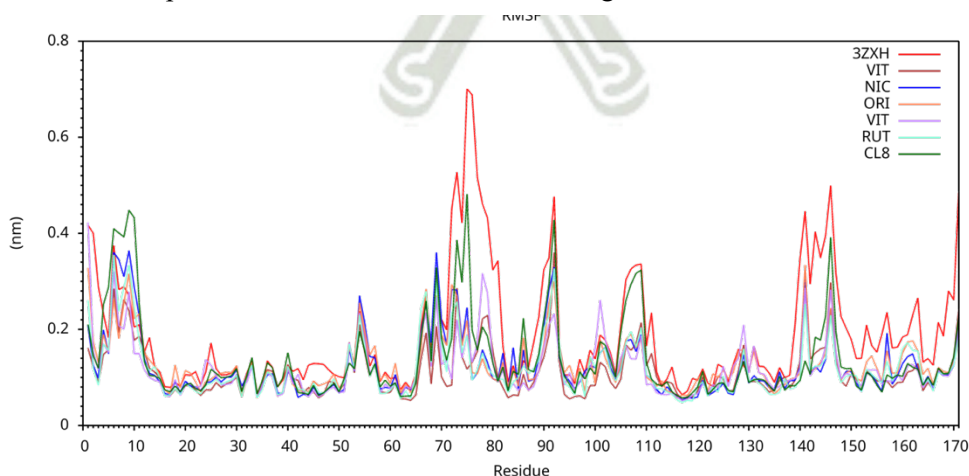
Componente	Energía (kJ/mol)
Energía de Van der Waals	-179.838 ± 11.201
Energía electrostática	-28.335 ± 9.512
Energía de solvatación polar	67.675 ± 12.093
Energía SASA	-19.180 ± 0.861
Energía SAV	-180.891 ± 15.234
Energía WCA	0.000 ± 0.000
Energía libre de unión	-340.569 ± 25.390

Fuente: Elaboración propia a partir del mmpbsa.

De todos los indicadores estructurales analizados para las diversas simulaciones de dinámica molecular, es el del RMSF la que podemos comparar, debido a que nos brindara información del efecto del ligando sobre las distintas regiones o zonas de la proteína. Así entonces, cuando realizamos la comparación de los RMSF de todos los ligandos con la proteína sola (ver Figura 3.38), podemos ahora en forma holística indicar que al inicio de la simulación de dinámica molecular, los ligandos CL8 y el NIC entre los 5 a 13 residuos presentan una mayor movimiento o fluctuación, luego hasta antes del residuo 70 todos tienen la misma fluctuación que la proteína sola, luego de ello, hasta el residuo 83, podemos observar que casi todos los ligando generan en esta zona una interacción estabilizante. Cabe resaltar que en el caso de la CL8 es de los ligandos que genera una fluctuación similar a la proteína sola, en la region entre los residuos 70 a 76, las fluctuaciones entre la región de residuos 84 al 105 son similares a la proteína, esto debido a que probablemente no sea la región de interacción, y es entre los residuos 106 a 110 que también podemos observar una reducción de la fluctuación, pero es solo el caso de la CL8 que genera las fluctuaciones similares a la proteína sola; no es hasta los residuos 138 al 171 que la proteína presenta una mayor fluctuación, y todos los residuos excepto el NIC presentan un comportamiento similar, lo que nos lleva a pensar que la interacción para el caso del NIC y CL8 son de naturaleza estabilizante. Lo importante de esta gráfica, es que ninguno de los ligandos induce a una mayor fluctuación de la proteína sino que, en todos los casos reduce la fluctuación. Excepto entre los residuos 04 al 13, donde observamos que la interacción genera un mayor movimientos de estos residuos.

**Figura 3.38**

Comparación de los RMSF de todos los ligandos con la Proteína sola



Fuente: Elaboración propia con GROMACS 2022.3 y graficado en xmgrace.

Ahora bien, podemos resumir los resultados del análisis en la siguiente Tabla 3.8 comparando los resultados que fueron obtenidos mediante MMPBSA con g\_mmpbsa. Ordenados de mayor a menor afinidad:

**Tabla 3.8**

Contribuciones energéticas a la energía libre de interacción de los complejos en kJ/mol

Ligando	VdW	Electrostática	Solvatación Polar	Energía libre de Unión
NIC	-195,016±16,048	-23,184±16,423	62,054±13,573	-349,348±29,041
CL8	-179,838±11,201	-28,335±9,512	67,675±12,093	-340,569±25,390
RUT	-185,540±15,493	-9,496±13,381	70,435±13,376	-318,869±33,779
ORI	-138,771±7,851	-44,140±14,284	71,784±12,807	-256,268±25,676
VIT	-144,728±16,022	-13,974±11,761	54,202±16,337	-252,608±32,282
API	-142,225±15,464	-16,614±9,765	83,626±19,115	-224,204±31,577

Fuente: Elaboración propia de comparación a partir los diferentes resultados del mmpbsa.

Los ligandos con mayor afinidad (NIC y CL8) mostraron un equilibrio favorable entre las interacciones hidrofóbicas Van der Waals, que sería su fuerza estabilizadora. La Nicotiflorina, en particular, destacó por su combinación de fuerte interacción de Van der Waals y valores moderados de solvatación, lo que refuerza su potencial como inhibidor natural de MMP-13. La electrostática corresponde a las interacciones entre las cargas parciales de los átomos del ligando y de la proteína MMP-13, y están relacionadas directamente con la energía libre de interacción para verificar si es termonidámicamente favorable o no, Un valor electrostático negativo indica una interacción atractiva como una mayor afinidad de unión. En la tabla comparativa se observa que el ligando ORI presentó la contribución electrostática más negativa (-44,140±14,284 kJ/mol), lo que indica una interacción fuertemente atractiva con el entorno cargado de la proteína. RUT y VIT muestran valores electrostáticos menos pronunciados, lo que sugiere que su afinidad está relacionada con los valores de Van der Waals. Aunque NIC no carga con valores extremos, estos de igual manera no penaliza la interacción al tener un valor moderado. La solvatación polar de igual manera, para NIC no es excesiva. Los resultados muestran que estos términos son relevantes y consistentes con el

patrón general de afinidad, reforzando la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la unión ligando-MMP-13. Donde NIC se posiciona como el ligando con mayor afinidad hacia MMP-13, superando al CL8. Al comparar a la NIC con el inhibidor sintético CL8, se observa que NIC presentó una mayor afinidad global hacia MMP-13, con una energía libre de interacción más negativa ( $-349,348 \pm 29,041$ ) frente a CL8 ( $-340,569 \pm 25,390$ ). De igual manera, ambas moléculas mostraron un equilibrio favorable entre las distintas contribuciones energéticas, destacando principalmente las interacciones hidrofóbicas de tipo Van der Waals, que actúan como la principal fuerza estabilizadora del complejo. NIC, en particular, sobresale por presentar la interacción de Van der Waals más intensa del grupo ( $-195,016 \pm 16,048$ ), acompañada de una energía de solvatación polar moderada ( $62,054 \pm 13,573$ ), lo que refuerza su potencial como inhibidor eficaz de MMP-13. Siguiendo con el análisis, la energía electrostática, que representa las interacciones entre las cargas parciales del ligando y la proteína, también juega un papel importante en la estabilidad del complejo. En la tabla se observa que el ligando ORI presentó la contribución electrostática más negativa ( $-44,140 \pm 14,284$ ), lo que indica una fuerte interacción con regiones cargadas del sitio activo de MMP-13. En contraste resultados como RUT y VIT mostraron valores electrostáticos menos pronunciados, lo que sugiere que su afinidad depende de mayor medida de las interacciones de Van der Waals. Aunque NIC no exhibe la mayor contribución electrostática del grupo, su valor moderadamente negativo ( $-23,184 \pm 16,423$ ) no penaliza significativamente la interacción, permitiendo un balance energético general favorable. Del mismo modo, la energía de solvatación polar, aunque positiva, no alcanza niveles que comprometan la estabilidad del complejo. Además, aunque ORI presentó la contribución electrostática más negativa ( $-44,140 \pm 14,284$ ), una fuerte interacción de regiones cargadas del sitio activo, no se traduce a una alta afinidad global, ya que su energía libre de unión es baja a comparación de los otros ligandos ( $-256,268 \pm 25,676$ ). Esto sugiere que, a pesar de su ventaja electrostática, otros factores como una menor contribución por solvatación polar limitan su capacidad de unión efectiva a la proteína. Por último, en el análisis energético, las contribuciones de SASA, SAV y WCA se consideraron menos relevantes en comparación con los otros componentes. La energía de SASA, aunque refleja interacciones no polares, mostró valores bajos y similares entre todos los ligandos, lo que no resulta que sean relevantes en el contexto de discernimiento. La energía de SAV tiene un valor referencial al no ser incluida en el cálculo directo de la energía libre de interacción. En consiguiente, la energía de WCA resultó ser nula en todos los casos, lo que confirma su irrelevancia en el sistema evaluado.

## CONCLUSIONES

Del desarrollo de nuestra investigación que fue conducente a la prestación de esta tesis, hemos podido hallar las siguientes conclusiones:

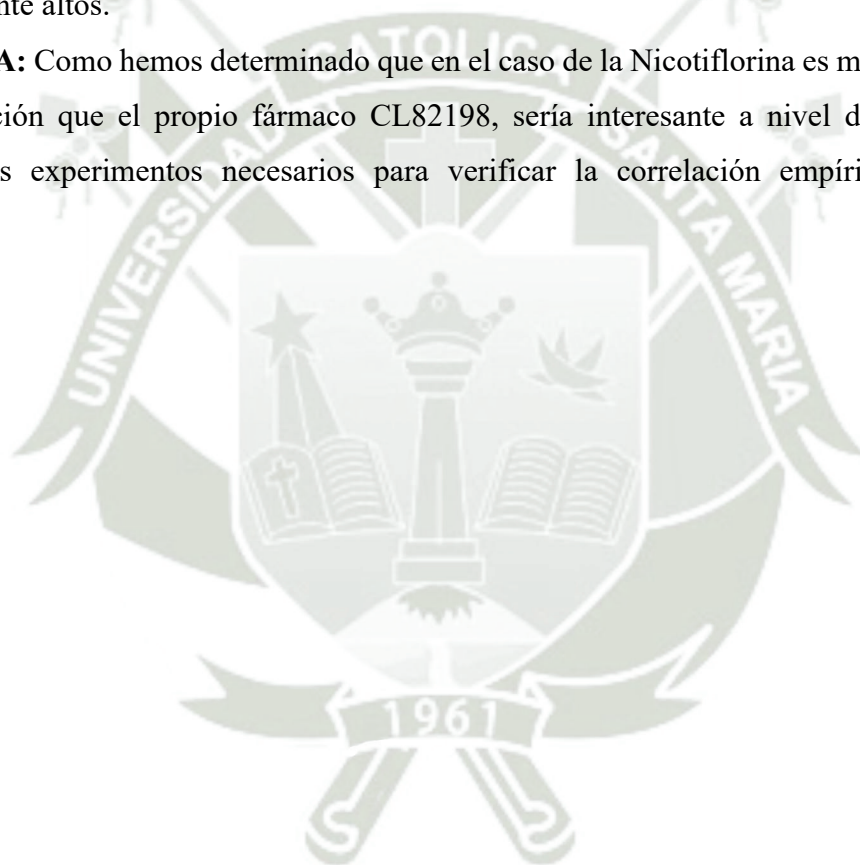
- Las estructuras tridimensionales de los cinco flavonoides naturales (rutina, nicotiflorina, orientina, vitexina y apigetrina) junto con el inhibidor sintético CL-82198 y la metaloproteinasa MMP-13, fueron correctamente obtenidas y optimizadas a partir de bases de datos públicas. El modelado de los residuos faltantes de la MMP-13 mediante Modeller permitió generar una conformación estructuralmente estable y adecuada para los análisis computacionales posteriores.
- Los resultados del acoplamiento molecular indicaron que los flavonoides presentan modos de unión favorables en la región catalítica de la MMP-13. La selección de las conformaciones con menor energía de interacción permitió identificar interacciones comparables e incluso superiores al inhibidor de referencia CL-82198.
- Las simulaciones de dinámica molecular a 200 ns confirmaron la estabilidad de los complejos MMP-13–ligando bajo condiciones fisiológicas, con desplazamientos atómicos controlados y estructuras globales consistentes a lo largo del tiempo de simulación.
- Los análisis de RMSD, RMSF, radio de giro (Rg) y los diagramas de Ramachandran evidenciaron que todos los complejos conservaron una conformación cuaternaria compatible con la ocurrencia natural de la proteína, lo que sugiere que las interacciones formadas son estructuralmente factibles y estables.
- El cálculo de la energía libre de unión mediante el método MMPBSA mostró que la afinidad de los flavonoides hacia la MMP-13 sigue el orden: nicotiflorina > CL-82198 > rutina > orientina > vitexina > apigetrina, destacando la capacidad de la nicotiflorina y la rutina para superar energéticamente al inhibidor sintético.
- En conjunto, los resultados sugieren que hay un potencial en el uso de flavonoides naturales (especialmente nicotiflorina y rutina) como candidatos prometedores para el desarrollo de terapias dirigidas contra la osteoartritis, validando el uso de herramientas de simulación molecular como una estrategia confiable y económica para la predicción de inhibidores enzimáticos.

## RECOMENDACIONES

Dentro de las recomendaciones que dejamos a nuevos investigadores al respecto son:

**PRIMERA:** Debido a los largos tiempos de corridas de las simulaciones de dinámica molecular que se tuvieron que realizar tanto para la proteína sola como para los sistemas interactuantes, se recomienda utilizar maquinas de supercomputo adecuados, ya que nuestras estaciones de trabajo, si bien pueden realizarlos, los tiempos de calculo son realmente altos.

**SEGUNDA:** Como hemos determinado que en el caso de la Nicotiflorina es mucho mas eficaz su interacción que el propio fármaco CL82198, sería interesante a nivel de laboratorio el realizar los experimentos necesarios para verificar la correlación empírica de nuestros resultados.



## REFERENCIAS

1. Felson DT, Niu J, Clancy M, Sack B, Aliabadi P, Zhang Y. Effect of recreational physical activities on the development of knee osteoarthritis in older adults of different weights: The Framingham Study. *Arthritis Care Res.* 15 de febrero de 2007;57(1):6-12.
2. Yao Q, Wu X, Tao C, Gong W, Chen M, Qu M, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 3 de febrero de 2023;8(1):56.
3. Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* febrero de 2022;30(2):184-95.
4. Maqbool M, Fekadu G, Jiang X, Bekele F, Tolossa T, Turi E, et al. An up to date on clinical prospects and management of osteoarthritis. *Ann Med Surg.* diciembre de 2021;72:103077.
5. Colombo GL, Heiman F, Peduto I. Utilization of Healthcare Resources in Osteoarthritis: A Cost of Illness Analysis Based on Real-World Data in Italy. *Ther Clin Risk Manag.* abril de 2021;Volume 17:345-56.
6. Quicke JG, Conaghan PG, Corp N, Peat G. Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy. *Osteoarthritis Cartilage.* febrero de 2022;30(2):196-206.
7. Bortoluzzi A, Furini F, Scirè CA. Osteoarthritis and its management - Epidemiology, nutritional aspects and environmental factors. *Autoimmun Rev.* noviembre de 2018;17(11):1097-104.
8. Leung YY, Thumboo J. An overview of OA research in two urban APLAR populations. *Int J Rheum Dis.* mayo de 2011;14(2):130-5.
9. Jiménez G, Cobo-Molinos J, Antich C, López-Ruiz E. Osteoarthritis: Trauma vs Disease. En: Oliveira JM, Pina S, Reis RL, San Roman J, editores. *Osteochondral Tissue Engineering [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [citado 8 de agosto de 2025]. p. 63-83. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1059). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-76735-2\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-76735-2_3)*
10. Knights AJ, Redding SJ, Maerz T. Inflammation in osteoarthritis: the latest progress and ongoing challenges. *Curr Opin Rheumatol.* marzo de 2023;35(2):128-34.
11. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 24 de julio de 2008;454(7203):428-35.
12. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 1 de febrero de 2008;118(2):413-20.
13. L. Kiss A. Inflammation in Focus: The Beginning and the End. *Pathol Oncol Res.* 4 de enero de 2022;27:1610136.

14. Vincent TL, McClurg O, Troeberg L. The Extracellular Matrix of Articular Cartilage Controls the Bioavailability of Pericellular Matrix-Bound Growth Factors to Drive Tissue Homeostasis and Repair. *Int J Mol Sci.* 26 de mayo de 2022;23(11):6003.
15. Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *J Dev Biol.* 18 de diciembre de 2015;3(4):177-92.
16. Yamamoto K, Okano H, Miyagawa W, Visse R, Shitomi Y, Santamaria S, et al. MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1. *Matrix Biol.* diciembre de 2016;56:57-73.
17. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De La Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 20 de diciembre de 2020;21(24):9739.
18. Geervliet E, Bansal R. Matrix Metalloproteinases as Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Liver Diseases. *Cells.* 13 de mayo de 2020;9(5):1212.
19. Mazur CM, Woo JJ, Yee CS, Fields AJ, Acevedo C, Bailey KN, et al. Osteocyte dysfunction promotes osteoarthritis through MMP13-dependent suppression of subchondral bone homeostasis. *Bone Res.* 5 de noviembre de 2019;7(1):34.
20. Caradonna F, Consiglio O, Luparello C, Gentile C. Science and Healthy Meals in the World: Nutritional Epigenomics and Nutrigenetics of the Mediterranean Diet. *Nutrients.* 11 de junio de 2020;12(6):1748.
21. Rahmati M, Nalesso G, Mobasheri A, Mozafari M. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing Res Rev.* noviembre de 2017;40:20-30.
22. Kulkarni P, Martson A, Vidya R, Chitnavis S, Harsulkar A. Pathophysiological landscape of osteoarthritis. En: *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2021 [citado 8 de agosto de 2025]. p. 37-90. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242320300378>
23. Jang S, Lee K, Ju JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci.* 5 de marzo de 2021;22(5):2619.
24. Laslett LL, Pelletier JP, Cicuttini FM, Jones G, Martel-Pelletier J. Measuring Disease Progression in Osteoarthritis. *Curr Treat Options Rheumatol.* junio de 2016;2(2):97-110.
25. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis. *Med Clin North Am.* marzo de 2020;104(2):293-311.
26. Leifer VP, Katz JN, Losina E. The burden of OA-health services and economics. *Osteoarthritis Cartilage.* enero de 2022;30(1):10-6.
27. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age,

- gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis.* septiembre de 2014;73(9):1659-64.
28. Siviero P, Veronese N, Smith T, Stubbs B, Limongi F, Zambon S, et al. Association Between Osteoarthritis and Social Isolation: Data From the EPOSA Study. *J Am Geriatr Soc.* enero de 2020;68(1):87-95.
  29. He Y, Li Z, Alexander PG, Ocasio-Nieves BD, Yocum L, Lin H, et al. Pathogenesis of Osteoarthritis: Risk Factors, Regulatory Pathways in Chondrocytes, and Experimental Models. *Biology.* 29 de julio de 2020;9(8):194.
  30. March L, Little C. ARTICULAR CARTILAGE IN HEALTH AND DISEASE. En: *The Musculoskeletal System* [Internet]. Elsevier; 2010 [citado 9 de agosto de 2025]. p. 77-95. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702033773000068>
  31. Bobacz K, Sunk IG. Age and Joints. En: *Handbook of Models for Human Aging* [Internet]. Elsevier; 2006 [citado 9 de agosto de 2025]. p. 841-51. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123693914500710>
  32. Pawlak Z, Urbaniak W, Oloyede A. Natural articular joints: model of lamellar-roller-bearing lubrication and the nature of the cartilage surface. En: *Biomaterials and Medical Tribology* [Internet]. Elsevier; 2013 [citado 9 de agosto de 2025]. p. 253-310. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857090171500065>
  33. Chen S, Fu P, Wu H, Pei M. Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell Tissue Res.* octubre de 2017;370(1):53-70.
  34. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health Multidiscip Approach.* noviembre de 2009;1(6):461-8.
  35. Brody LT. Knee osteoarthritis: Clinical connections to articular cartilage structure and function. *Phys Ther Sport.* noviembre de 2015;16(4):301-16.
  36. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 1 de agosto de 2008;87(1):77-95.
  37. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, et al. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* agosto de 2014;1840(8):2414-40.
  38. Sefat F, Raja TI, Zafar MS, Khurshid Z, Najeeb S, Zohaib S, et al. Nanoengineered biomaterials for cartilage repair. En: *Nanoengineered Biomaterials for Regenerative Medicine* [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 9 de agosto de 2025]. p. 39-71. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012813355200003X>

39. Frisbie DD. Synovial Joint Biology and Pathobiology. En: Equine Surgery [Internet]. Elsevier; 2012 [citado 9 de agosto de 2025]. p. 1096-114. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437708677000788>
40. Olson EJ, Carlson CS. Bones, Joints, Tendons, and Ligaments. En: Pathologic Basis of Veterinary Disease [Internet]. Elsevier; 2017 [citado 9 de agosto de 2025]. p. 954-1008.e2. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323357753000163>
41. Killen MC, Charalambous CP. Advances in cartilage restoration techniques. En: Advances in Medical and Surgical Engineering [Internet]. Elsevier; 2020 [citado 9 de agosto de 2025]. p. 71-83. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128197127000061>
42. Fujii Y, Liu L, Yagasaki L, Inotsume M, Chiba T, Asahara H. Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 5 de junio de 2022;23(11):6316.
43. Lespasio MJ, Piuizzi NS, Husni ME, Muschler GF, Guarino A, Mont MA. Knee Osteoarthritis: A Primer. *Perm J.* diciembre de 2017;21(4):16-183.
44. Coaccioli S, Sarzi-Puttini P, Zis P, Rinonapoli G, Varrassi G. Osteoarthritis: New Insight on Its Pathophysiology. *J Clin Med.* 12 de octubre de 2022;11(20):6013.
45. Goldring MB, Kenneth B Marcu. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):224.
46. Kunlin Jin. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease.* 2010;1(2):72-4.
47. Müller L, Di Benedetto S, Pawelec G. The Immune System and Its Dysregulation with Aging. En: Harris JR, Korolchuk VI, editores. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [citado 9 de agosto de 2025]. p. 21-43. (Subcellular Biochemistry; vol. 91). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3681-2\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3681-2_2)
48. Manini TM, Hong SL, Clark BC. Aging and muscle: a neuron's perspective. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* enero de 2013;16(1):21-6.
49. Peshkova M, Lychagin A, Lipina M, Di Matteo B, Anzillotti G, Ronzoni F, et al. Gender-Related Aspects in Osteoarthritis Development and Progression: A Review. *Int J Mol Sci.* 2 de marzo de 2022;23(5):2767.
50. Laitner MH, Erickson LC, Society for Women's Health Research Osteoarthritis and Chronic Pain Working Group, Ortman E. Understanding the Impact of Sex and Gender in Osteoarthritis: Assessing Research Gaps and Unmet Needs. *J Womens Health.* 1 de mayo de 2021;30(5):634-41.
51. Tschon M, Contartese D, Pagani S, Borsari V, Fini M. Gender and Sex Are Key Determinants in Osteoarthritis Not Only Confounding Variables. A Systematic Review of Clinical Data. *J Clin Med.* 19 de julio de 2021;10(14):3178.

52. Stevens-Lapsley JE, Kohrt WM. Osteoarthritis in Women: Effects of Estrogen, Obesity and Physical Activity. *Womens Health*. julio de 2010;6(4):601-15.
53. Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):241.
54. Warner S, Valdes A. The Genetics of Osteoarthritis: A Review. *J Funct Morphol Kinesiol*. 10 de marzo de 2016;1(1):140-53.
55. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. febrero de 2014;28(1):5-15.
56. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *The Lancet*. abril de 2019;393(10182):1745-59.
57. Aubourg G, Rice SJ, Bruce-Wootton P, Loughlin J. Genetics of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. mayo de 2022;30(5):636-49.
58. Suri P, Morgenroth DC, Hunter DJ. Epidemiology of Osteoarthritis and Associated Comorbidities. *PM&R [Internet]*. mayo de 2012 [citado 9 de agosto de 2025];4(5S). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.pmrj.2012.01.007>
59. Grässel S, Zaucke F, Madry H. Osteoarthritis: Novel Molecular Mechanisms Increase Our Understanding of the Disease Pathology. *J Clin Med*. 30 de abril de 2021;10(9):1938.
60. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 1 de noviembre de 2016;31(sup1):177-83.
61. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*. 26 de abril de 2020;9(5):1076.
62. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. julio de 2021;184(15):3852-72.
63. Peng Z, Sun H, Bunpetch V, Koh Y, Wen Y, Wu D, et al. The regulation of cartilage extracellular matrix homeostasis in joint cartilage degeneration and regeneration. *Biomaterials*. enero de 2021;268:120555.
64. Rapp AE, Zaucke F. Cartilage extracellular matrix-derived matrikines in osteoarthritis. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 1 de febrero de 2023;324(2):C377-94.
65. Vincent TL, McClurg O, Troeberg L. The Extracellular Matrix of Articular Cartilage Controls the Bioavailability of Pericellular Matrix-Bound Growth Factors to Drive Tissue Homeostasis and Repair. *Int J Mol Sci*. 26 de mayo de 2022;23(11):6003.
66. Mehana ESE, Khafaga AF, El-Blehi SS. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sci*. octubre de 2019;234:116786.

67. Malemud CJ. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS. *Biochem Pharmacol.* julio de 2019;165:33-40.
68. Wang C, Greene D, Xiao L, Qi R, Luo R. Recent Developments and Applications of the MMPBSA Method. *Front Mol Biosci.* 10 de enero de 2018;4:87.
69. Barta TE, Becker DP, Bedell LJ, Easton AM, Hockerman SL, Kiefer J, et al. MMP-13 selective  $\alpha$ -sulfone hydroxamates: A survey of P1' heterocyclic amide isosteres. *Bioorg Med Chem Lett.* mayo de 2011;21(10):2820-2.
70. Becker DP, Villamil CI, Barta TE, Bedell LJ, Boehm TL, DeCrescenzo GA, et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of  $\beta$ - and  $\alpha$ -Piperidine Sulfone Hydroxamic Acid Matrix Metalloproteinase Inhibitors with Oral Antitumor Efficacy. *J Med Chem.* 1 de octubre de 2005;48(21):6713-30.
71. Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther.* diciembre de 2017;19(1):18.
72. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* abril de 2013;5(2):77-94.
73. Sergijenko A, Roelofs AJ, Riemen AHK, De Bari C. Bone marrow contribution to synovial hyperplasia following joint surface injury. *Arthritis Res Ther.* diciembre de 2016;18(1):166.
74. De Roover A, Escribano-Núñez A, Monteagudo S, Lories R. Fundamentals of osteoarthritis: Inflammatory mediators in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* octubre de 2023;31(10):1303-11.
75. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* noviembre de 2010;6(11):625-35.
76. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone.* agosto de 2012;51(2):249-57.
77. Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* julio de 2012;8(7):390-8.
78. Wang C, Gong S, Liu H, Cui L, Ye Y, Liu D, et al. Angiogenesis unveiled: Insights into its role and mechanisms in cartilage injury. *Exp Gerontol.* octubre de 2024;195:112537.
79. Rim YA, Ju JH. The Role of Fibrosis in Osteoarthritis Progression. *Life.* 23 de diciembre de 2020;11(1):3.
80. Remst DFG, Blaney Davidson EN, Vitters EL, Blom AB, Stoop R, Snabel JM, et al. Osteoarthritis-related fibrosis is associated with both elevated pyridinoline cross-link formation and lysyl hydroxylase 2b expression. *Osteoarthritis Cartilage.* enero de 2013;21(1):157-64.

81. Damerau A, Rosenow E, Alkhoury D, Buttgerit F, Gaber T. Fibrotic pathways and fibroblast-like synoviocyte phenotypes in osteoarthritis. *Front Immunol.* 4 de junio de 2024;15:1385006.
82. Li M, Yin H, Yan Z, Li H, Wu J, Wang Y, et al. The immune microenvironment in cartilage injury and repair. *Acta Biomater.* marzo de 2022;140:23-42.
83. Wojdasiewicz P, Poniatoski ŁA, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:1-19.
84. Fazio A, Di Martino A, Brunello M, Traina F, Marvi MV, Mazzotti A, et al. The involvement of signaling pathways in the pathogenesis of osteoarthritis: An update. *J Orthop Transl.* julio de 2024;47:116-24.
85. Raman S, FitzGerald U, Murphy JM. Interplay of Inflammatory Mediators with Epigenetics and Cartilage Modifications in Osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol.* 14 de marzo de 2018;6:22.
86. Raghu H, Lepus CM, Wang Q, Wong HH, Lingampalli N, Oliviero F, et al. CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* mayo de 2017;76(5):914-22.
87. Qi Z, Zhu J, Cai W, Lou C, Li Z. The role and intervention of mitochondrial metabolism in osteoarthritis. *Mol Cell Biochem.* junio de 2024;479(6):1513-24.
88. Zhang M, Wu J, Cai K, Liu Y, Lu B, Zhang J, et al. From dysfunction to healing: advances in mitochondrial therapy for Osteoarthritis. *J Transl Med.* 11 de noviembre de 2024;22(1):1013.
89. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother.* septiembre de 2020;129:110452.
90. Terkawi MA, Ebata T, Yokota S, Takahashi D, Endo T, Matsumae G, et al. Low-Grade Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Cellular and Molecular Mechanisms and Strategies for Future Therapeutic Intervention. *Biomedicines.* 10 de mayo de 2022;10(5):1109.
91. Pustjens MF, Mastbergen SC, Noort-Van Der Laan WH, Van Heerwaarden RJ, Lafeber FP. The biochemical interaction between subchondral bone and cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* abril de 2014;22:S352-3.
92. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone–cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage.* agosto de 2014;22(8):1077-89.
93. Thirumaran AJ, Deveza LA, Atukorala I, Hunter DJ. Assessment of Pain in Osteoarthritis of the Knee. *J Pers Med.* 14 de julio de 2023;13(7):1139.

94. Sethi V, Anand C, Della Pasqua O. Clinical Assessment of Osteoarthritis Pain: Contemporary Scenario, Challenges, and Future Perspectives. *Pain Ther.* junio de 2024;13(3):391-408.
95. Fu K, Robbins SR, McDougall JJ. Osteoarthritis: the genesis of pain. *Rheumatology.* 1 de mayo de 2018;57(suppl\_4):iv43-50.
96. Previtali D, Andriolo L, Di Laura Frattura G, Boffa A, Candrian C, Zaffagnini S, et al. Pain Trajectories in Knee Osteoarthritis—A Systematic Review and Best Evidence Synthesis on Pain Predictors. *J Clin Med.* 1 de septiembre de 2020;9(9):2828.
97. Oei EHG, Hirvasniemi J, Van Zadelhoff TA, Van Der Heijden RA. Osteoarthritis year in review 2021: imaging. *Osteoarthritis Cartilage.* febrero de 2022;30(2):226-36.
98. Hayashi D, Roemer FW, Link T, Li X, Kogan F, Segal NA, et al. Latest advancements in imaging techniques in OA. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* enero de 2022;14:1759720X221146621.
99. Roemer FW, Guermazi A, Demehri S, Wirth W, Kijowski R. Imaging in Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* julio de 2022;30(7):913-34.
100. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* marzo de 2001;69(3):89-95.
101. Mobasher A, Thudium CS, Bay-Jensen AC, Maleitzke T, Geissler S, Duda GN, et al. Biomarkers for osteoarthritis: Current status and future prospects. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* junio de 2023;37(2):101852.
102. Lynskey SJ, Macaluso MJ, Gill SD, McGee SL, Page RS. Biomarkers of Osteoarthritis—A Narrative Review on Causal Links with Metabolic Syndrome. *Life.* 8 de marzo de 2023;13(3):730.
103. Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, Brandi ML, Bruyère O, Chapurlat R, et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis.* noviembre de 2013;72(11):1756-63.
104. Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective Effects of Citrus Flavonoids. *J Agric Food Chem.* 1 de febrero de 2012;60(4):877-85.
105. Beecher GR. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J Nutr.* octubre de 2003;133(10):3248S-3254S.
106. Waheed Janabi AH, Kamboh AA, Saeed M, BiBi J, Naveed M, Huixia L. Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iran J Basic Med Sci [Internet].* diciembre de 2019 [citado 10 de agosto de 2025];(Online First). Disponible en: <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.35125.8353>
107. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5:e47.

108. Khan J, Deb PK, Priya S, Medina KD, Devi R, Walode SG, et al. Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effects and Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic Concerns. *Molecules*. 30 de junio de 2021;26(13):4021.
109. Xu Y, Tao Z, Jin Y, Yuan Y, Dong TTX, Tsim KWK, et al. Flavonoids, a Potential New Insight of *Leucaena leucocephala* Foliage in Ruminant Health. *J Agric Food Chem*. 25 de julio de 2018;66(29):7616-26.
110. Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, et al. Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. Lu JR, editor. *PLoS ONE*. 21 de noviembre de 2012;7(11):e49493.
111. Ye Y, Zhou J. The protective activity of natural flavonoids against osteoarthritis by targeting NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Front Endocrinol*. 14 de marzo de 2023;14:1117489.
112. Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int Immunopharmacol*. septiembre de 2011;11(9):1150-9.
113. Xu W, Lu H, Yuan Y, Deng Z, Zheng L, Li H. The Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids from Propolis via Nrf2 and NF- $\kappa$ B Pathways. *Foods*. 13 de agosto de 2022;11(16):2439.
114. National Center for Biotechnology Information [Internet]. 2025. Rutin. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rutin>
115. Jiang W, Gao J, Ming J, Li F. Influence of mulberry, pectin, rutin, and their combinations on  $\alpha$ -amylase activity and glucose absorption during starch digestion. *Food Chem*. febrero de 2025;465:142136.
116. Zieliński H, Wiczowski W, Honke J, Piskula MK. In Vitro Expanded Bioaccessibility of Quercetin-3-Rutinoside and Quercetin Aglycone from Buckwheat Biscuits Formulated from Flours Fermented by Lactic Acid Bacteria. *Antioxidants*. 8 de abril de 2021;10(4):571.
117. Kessas K, Lounis W, Chouari Z, Vejux A, Lizard G, Kharoubi O. Benefits of rutin on mitochondrial function and inflammation in an aluminum-induced neurotoxicity rat model: Potential interest for the prevention of neurodegeneration. *Biochimie*. julio de 2024;222:1-8.
118. Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr*. febrero de 2006;45(1):19-28.
119. Zhao X, Chen X, Yue C. Rutin Ameliorates Inflammation and Oxidative Stress in Ulcerative Colitis by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. *Cell Biochem Biophys*. diciembre de 2024;82(4):3715-26.
120. Chen X, Yu M, Xu W, Zou L, Ye J, Liu Y, et al. Rutin inhibited the advanced glycation end products-stimulated inflammatory response and extra-cellular matrix degeneration via

- targeting TRAF-6 and BCL-2 proteins in mouse model of osteoarthritis. *Aging*. 30 de septiembre de 2021;13(18):22134-47.
121. National Center for Biotechnology Information (2025) [Internet]. 2025. Nicotiflorin. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kaempferol-3-O-Rutinoside>
  122. Wang Y, Zhang S, Ni H, Zhang Y, Yan X, Gao Y, et al. Autophagy is involved in the neuroprotective effect of nicotiflorin. *J Ethnopharmacol*. octubre de 2021;278:114279.
  123. Li R, Guo M, Zhang G, Xu X, Li Q. Neuroprotection of Nicotiflorin in Permanent Focal Cerebral Ischemia and in Neuronal Cultures. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(9):1868-72.
  124. National Center for Biotechnology Information (2025) [Internet]. 2025. Orientin. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281675>
  125. Liu K, Li X, Liu Z, Ming X, Han B, Cai W, et al. Orientin Promotes Antioxidant Capacity, Mitochondrial Biogenesis, and Fiber Transformation in Skeletal Muscles through the AMPK Pathway. *J Agric Food Chem*. 27 de marzo de 2024;72(12):6226-35.
  126. Long Q, Ma T, Wang Y, Chen S, Tang S, Wang T, et al. Orientin alleviates the inflammatory response in psoriasis like dermatitis in BALB/c mice by inhibiting the MAPK signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. junio de 2024;134:112261.
  127. Song X, Fan X. Protective effects of orientin against spinal cord injury in rats. *NeuroReport*. 7 de agosto de 2024;35(12):753-62.
  128. Vasudevan Sajini D, Thaggikuppe Krishnamurthy P, Chakkittukandiyil A, Mudavath RN. Orientin Modulates Nrf2-ARE, PI3K/Akt, JNK-ERK1/2, and TLR4/NF-kB Pathways to Produce Neuroprotective Benefits in Parkinson's Disease. *Neurochem Res*. junio de 2024;49(6):1577-87.
  129. National Center for Biotechnology Information (2025) [Internet]. 2025. Vitexin. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitexin>
  130. Duan T, Li M, Lin Z, Meng L, Li M, Xia T, et al. The Protective Effect of Vitexin on Hypertensive Nephropathy Rats. *Kidney Blood Press Res*. 30 de julio de 2024;49(1):753-62.
  131. Huang K, Ding R, Lai C, Wang H, Fan X, Chu Y, et al. Vitexin attenuates neuropathic pain by regulating astrocyte autophagy flux and polarization via the S1P/ S1PR1-PI3K/ Akt axis. *Eur J Pharmacol*. octubre de 2024;981:176848.
  132. Han X, Li L, Xie J, Lei Q, Li Y, Liu H, et al. Vitexin promotes the anti-senescence effect via inhibiting JAK2/STAT3 in D-Galactose-induced progeria mice and stress-induced premature senescence. *Eur J Pharmacol*. octubre de 2024;980:176865.
  133. Gu L, Yao X, An R, Guo X. Determination and antioxidant analysis of seven flavonoids in bamboo-leaf extracts. *Chin J Chromatogr*. 1 de octubre de 2024;42(10):972-8.

134. Chen SM, Wang MH, Chang KC, Fang CH, Lin YW, Tseng HC. Vitexin Mitigates Haloperidol-Induced Orofacial Dyskinesia in Rats through Activation of the Nrf2 Pathway. *Int J Mol Sci.* 23 de septiembre de 2024;25(18):10206.
135. National Center for Biotechnology Information (2025) [Internet]. 2025. Apigenin. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Apigenin-7-O-glucoside>
136. Ijaz MU, Yaqoob S, Hamza A, David M, Afsar T, Husain FM, et al. Apigenin ameliorates doxorubicin prompted testicular damage: biochemical, spermatological and histological based study. *Sci Rep.* 20 de abril de 2024;14(1):9049.
137. Gutiérrez JM, Albulescu LO, Clare RH, Casewell NR, Abd El-Aziz TM, Escalante T, et al. The Search for Natural and Synthetic Inhibitors That Would Complement Antivenoms as Therapeutics for Snakebite Envenoming. *Toxins.* 29 de junio de 2021;13(7):451.
138. National Center for Biotechnology Information (2025) [Internet]. 2025. CL82198. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cl82198>
139. Wang M, Sampson ER, Jin H, Li J, Ke QH, Im HJ, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 8 de enero de 2013;15(1):R5.
140. Wu X, Su P. Very brief introduction to quantum chemistry. En: *Quantum Chemistry in the Age of Machine Learning* [Internet]. Elsevier; 2023 [citado 10 de agosto de 2025]. p. 3-25. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323900492000068>
141. K. I. Ramachandran, Deepa Gopakumar. *Computational Chemistry and Molecular Modeling* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [citado 10 de agosto de 2025]. (Krishnan Namboori). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77304-7>
142. *Computer Aided Drug Design (CADD): From Ligand-Based Methods to Structure-Based Approaches* [Internet]. Elsevier; 2022 [citado 10 de agosto de 2025]. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20200040399>
143. Leach AR. *Ligand-Based Approaches: Core Molecular Modeling.* En: *Comprehensive Medicinal Chemistry II* [Internet]. Elsevier; 2007 [citado 10 de agosto de 2025]. p. 87-118. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B008045044X002467>
144. Leach AR. *Molecular Modelling: Principles and Applications.* 2nd ed. Vol. 1. Harlow, England: Pearson Education Limited; 2001. 744 p.
145. Lin FY, MacKerell AD. Force Fields for Small Molecules. En: Bonomi M, Camilloni C, editores. *Biomolecular Simulations* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [citado 10 de agosto de 2025]. p. 21-54. (Methods in Molecular Biology; vol. 2022). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9608-7\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9608-7_2)
146. Hsieh MJ, Luo R. Balancing Simulation Accuracy and Efficiency with the Amber United Atom Force Field. *J Phys Chem B.* 4 de marzo de 2010;114(8):2886-93.

147. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem.* marzo de 2010;31(4):671-90.
148. Markiewicz M, Szczelina R, Pasenkiewicz-Gierula M. Data for molecular dynamic simulations in the OPLSAA force field: Partial charges of cholesterol, C7-hydroxycholesterol and C7-hydroperoxycholesterol, torsional parameters for the hydroperoxy group of C7-hydroperoxycholesterol. *Data Brief.* diciembre de 2021;39:107483.
149. Schmid N, Eichenberger AP, Choutko A, Riniker S, Winger M, Mark AE, et al. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J.* julio de 2011;40(7):843-56.
150. Chou CC, Buehler MJ. Bond energy effects on strength, cooperativity and robustness of molecular structures. *Interface Focus.* 6 de octubre de 2011;1(5):734-43.
151. Keil RG, Mayer LM. Mineral Matrices and Organic Matter. En: *Treatise on Geochemistry [Internet].* Elsevier; 2014 [citado 10 de agosto de 2025]. p. 337-59. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978008095975701024X>
152. Patil VM, Gupta SP, Masand N, Balasubramanian K. Experimental and computational models to understand protein-ligand, metal-ligand and metal-DNA interactions pertinent to targeted cancer and other therapies. *Eur J Med Chem Rep.* abril de 2024;10:100133.
153. Pazos F. Computational prediction of protein functional sites—Applications in biotechnology and biomedicine. En: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology [Internet].* Elsevier; 2022 [citado 10 de agosto de 2025]. p. 39-57. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876162321000936>
154. Weber T, Kim HU. The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. *Synth Syst Biotechnol.* junio de 2016;1(2):69-79.
155. Rashid B, Bashir Z, Rasool B, Ravishankar LV, Mohamad OAA, Parray JA. Introduction to bioinformatics in microbial biotechnology. En: *Computational Genomics and Structural Bioinformatics in Microbial Science [Internet].* Elsevier; 2025 [citado 10 de agosto de 2025]. p. 3-28. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443315503000019>
156. Mukhi M, Vishwanathan AS. Identifying potential inhibitors of biofilm-antagonistic proteins to promote biofilm formation: a virtual screening and molecular dynamics simulations approach. *Mol Divers.* agosto de 2022;26(4):2135-47.
157. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 1 de enero de 2000;28(1):235-42.
158. Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, et al. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology,

- bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res.* 8 de enero de 2021;49(D1):D437-51.
159. Goodsell DS, Zardecki C, Di Costanzo L, Duarte JM, Hudson BP, Persikova I, et al. RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. *Protein Sci.* enero de 2020;29(1):52-65.
160. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Res.* 6 de enero de 2025;53(D1):D1516-25.
161. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Res.* 6 de enero de 2025;53(D1):D1516-25.
162. Bauer P, Hess B, Lindahl E. GROMACS 2022.3 Manual. 2 de septiembre de 2022 [citado 10 de agosto de 2025]; Disponible en: <https://zenodo.org/record/7037337>
163. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* septiembre de 2015;1-2:19-25.
164. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* octubre de 2004;25(13):1605-12.
165. Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics.* diciembre de 2006;7(1):339.
166. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model.* 23 de agosto de 2021;61(8):3891-8.
167. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 30 de enero de 2010;31(2):455-61.
168. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, et al. Gaussian~16 Revision C.01. 2016.
169. Roy Dennington, Todd A. Keith, John M. Millam. GaussView Version 6. 2019.
170. Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci.* enero de 2018;27(1):129-34.
171. Jorgensen WL, Tirado-Rives J. Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems. *Proc Natl Acad Sci.* 10 de mayo de 2005;102(19):6665-70.

172. Dodda LS, Vilseck JZ, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. 1.14\*CM1A-LBCC: Localized Bond-Charge Corrected CM1A Charges for Condensed-Phase Simulations. *J Phys Chem B*. 20 de abril de 2017;121(15):3864-70.
173. Dodda LS, Cabeza de Vaca I, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. LigParGen web server: an automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands. *Nucleic Acids Res*. 3 de julio de 2017;45(W1):W331-6.
174. Valdés-Tresanco MS, Valdés-Tresanco ME, Valiente PA, Moreno E. gmx\_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *J Chem Theory Comput*. 12 de octubre de 2021;17(10):6281-91.
175. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci*. 28 de agosto de 2001;98(18):10037-41.
176. Kumari R, Kumar R, Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. *g\_mmpbsa* —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J Chem Inf Model*. 28 de julio de 2014;54(7):1951-62.
177. Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci*. enero de 2018;27(1):112-28.
178. Clark KL, Kulathila R. RCSB PDB. 2011. MMP-13 complexed with 2-Naphthylsulfonamide hydroxamic acid inhibitor. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/3ZXH>
179. Tommasi RA, Weiler S, McQuire LW, Rogel O, Chambers M, Clark K, et al. Potent and selective 2-naphthylsulfonamide substituted hydroxamic acid inhibitors of matrix metalloproteinase-13. *Bioorg Med Chem Lett*. noviembre de 2011;21(21):6440-5.