

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Medicina Humana
Escuela Profesional de Medicina Humana



**EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS
INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL
TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE – CIIM UCSM**

Tesis presentada por los Bachilleres:

Albarracin Copaja, Gregory Gianfranco

Chalco Nuñez, Alejandra Lourdes

Para optar por el Título Profesional de:
Médico Cirujano

Asesor:

Dr. Tapia Pérez, Rafael Freddy

Arequipa - Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
MEDICINA HUMANA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 26 de Abril del 2023

Dictamen: 009340-C-EPMH-2023

Visto el borrador del expediente 009340, presentado por:

2016801842 - CHALCO NUÑEZ ALEJANDRA LOURDES
2016800271 - ALBARRACIN COPAJA GREGORY GIANFRANCO

Titulado:

**EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA
PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE ?
CIIM UCSM**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29296240 - MONTANCHEZ CARAZAS EDGAR
DICTAMINADOR**



**30857055 - LOPEZ TICONA ALDO GERARDO
DICTAMINADOR**



**46460112 - ZEVALLOS ZUÑIGA FRANZ DIEGO
DICTAMINADOR**



EPÍGRAFE

No te detengas

Siempre ten presente que ...

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, hay otro desafío.

Mientras estés viva, siéntete viva.

Sigue, aunque todos esperen que abandones.

No dejes que se oxide el hierro que hay en ti.

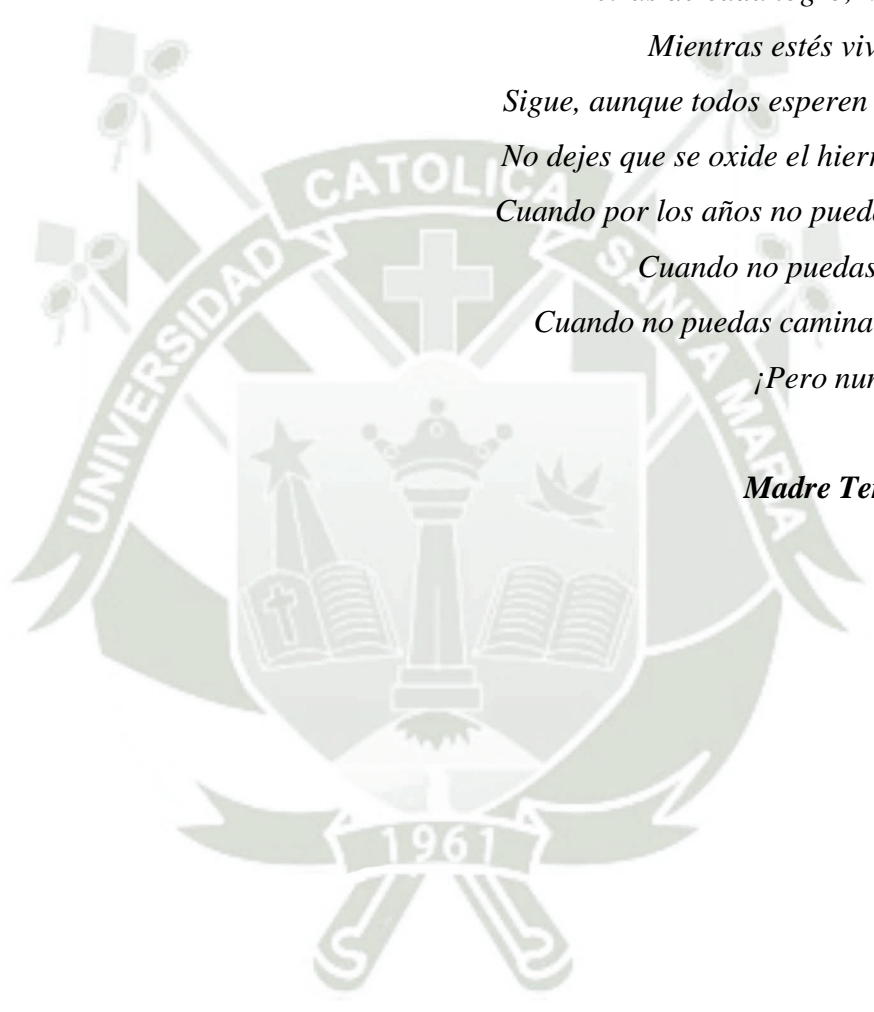
Cuando por los años no puedas correr, trota.

Cuando no puedas trotar, camina.

Cuando no puedas caminar, usa el bastón.

¡Pero nunca te detengas!

Madre Teresa de Calcuta



DEDICATORIA

A Dios, por nunca soltarme y por darme la fuerza para seguir adelante a pesar de todo.

*A mi padre, el Dr. Benito Albarracin por heredarme todo su amor por la vida y ser la
luz de mis ojos, ahora y siempre.*

*A mi madre, la Dra. Teresa Copaja por enseñarme a ser fuerte y a nunca rendirme
frente a nada ni nadie.*

*A mis abuelos, Epifanio y Manuela por ser mis segundos padres y por darme todo su
amor incondicional hasta el fin.*

*A mis amigos, quienes llamo hermanos, por ser mi motivación y ejemplo para seguir
superándome en la vida.*

A Dios que me lo ha dado todo

*A mi madre, Idania, por siempre estar para mí, por darme los mejores consejos y por
enseñarme que la vida es el camino.*

A mi padre, Jaime, por creer en mí y apoyarme en cada decisión.

A mi hermana, Ydania, por enseñarme que un libro te hace mejor persona.

Y a ti mamá Inés, por ser mi fortaleza y cuidarme desde el cielo.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirnos llegar hasta aquí, a nuestra familia y amigos, por estar codo a codo con nosotros en las buenas, malas y peores.

A la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica de Santa María, donde desarrollamos nuestros estudios y reforzamos nuestra vocación de servicio,

A la Clínica San Juan de Dios, Hospital III de Goyeneche y Centro de Salud 15 de agosto por darnos la fuerza y confianza para convertirnos en médicos.

A CIEM y SOCIMEP por inculcarnos el amor a la investigación y a expandir nuestros horizontes.

Al Dr. Badhin Gómez y al Centro de Investigación en Ingeniería Molecular (CIIM) por recibirnos con los brazos abiertos y alcanzar los objetivos de nuestra tesis.

A nuestros asesores Dr. Aldo López, Dr. Franz Zevallos, Dr. Edgar Montanez y Dr. Rafael Tapia por los consejos para poder culminar el presente estudio satisfactoriamente.

RESUMEN

Introducción. La artritis reumatoide es una enfermedad crónica degenerativa cuyo tratamiento se basa en el uso de antiinflamatorios, inmunosupresores, corticoides y en últimas instancias terapia biológica, sin embargo al estudiar cada vez más la fisiopatología de dicha enfermedad se ha descubierto nuevos mecanismos por los cuales es producida la destrucción del cartílago articular del ser humano, dichas vías abren la posibilidad de invención de nuevos componentes que puedan bloquear la activación de los mismos, tal es la Peptidil Arginina Deiminasa tipo IV, la cual juega un rol muy importante en la Citrulinación de proteínas y por ende, en la producción de los Anticuerpos anti péptido citrulinados, los cuales son los responsables de la activación de la respuesta inmune desmedida contra el cartílago articular produciendo las manifestaciones clínicas en el paciente, el fin de este trabajo es dilucidar el comportamiento de dichos compuestos químicos frente a la Peptidil Arginina Deiminasa por medio de dinámica molecular, así como estudiar el comportamiento de la Peptidil Arginina Deiminasa en su estado basal y la unión de esta ante los diferentes inhibidores escogidos para el presente estudio

Materiales y Métodos: Se llevó a cabo un estudio experimental in silico, donde las estructuras se adquirieron del Protein Data Bank (PDB) y Gaussian View (GW). La simulación de dinámica molecular (DM) se efectuó utilizando el software GROMACS v.5.0.5. La validación de las estructuras se realizó mediante el cálculo de RMSD (desviación cuadrática media), radio de giro (RG) y el diagrama de Ramachandran. Posteriormente, se analizaron las fluctuaciones tras la interacción.

Resultados. Se obtuvo un acoplamiento adecuado de los diferentes compuestos, se observa una unión estable, así como una fluctuación en los primeros 200 aa de la Peptidil Arginina Deiminasa además de picos energéticos en el Radio de Giro lo cual indica un desacoplamiento de los péptidos de la proteína en estudio.

Conclusión. Se validó los modelos estructurales, la variación conformacional y energía generada por las interacciones moleculares entre la PAD4 y los diferentes compuestos químicos, mediante herramientas computacionales. Este estudio contribuye en el planteamiento de nuevos potenciales fármacos para el tratamiento de la Artritis Reumatoide.

Palabras Clave: Artritis reumatoide, Peptidil Arginina Deiminasa, Compuestos químicos, In silico, Simulación de Dinámica Molecular.

ABSTRACT

Introduction. Rheumatoid arthritis is a chronic degenerative disease whose treatment is based on the use of anti-inflammatories, immunosuppressants, corticosteroids and ultimately biological therapy, however, by studying more and more the pathophysiology of this disease, new mechanisms have been discovered by which it is produced. destruction of human articular cartilage, these pathways open up the possibility of inventing new components that can block their activation, such as Peptidyl Arginine Deiminase type IV, which plays a very important role in protein citrullination and therefore, in the production of citrullinated anti-peptide antibodies, which are responsible for the activation of the excessive immune response against articular cartilage, producing clinical manifestations in the patient, the purpose of this work is to elucidate the behavior of said compounds. against Peptidyl Arginine Deiminase by means of molecular dynamics, as well as studying the behavior of Peptidyl Arginine Deiminase in its basal state and its binding to the different inhibitors chosen for the present study.

Materials and Methods: An *in silico* experimental study was carried out, where the structures were acquired from the Protein Data Bank (PDB) and Gaussian View (GW). Molecular dynamics (MD) simulation was performed using the GROMACS v.5.0.5 software. The validation of the structures was carried out by calculating the RMSD (root mean square deviation), radius of gyration (RG) and the Ramachandran diagram. Subsequently, the fluctuations after the interaction were analyzed.

Results. An adequate coupling of the different compounds was obtained, a stable union is observed, as well as a fluctuation in the first 200 aa of the Peptidyl Arginine Deiminase, in addition to energetic peaks in the Radius of Turn, which indicates an uncoupling of the peptides from the protein. in study

Conclusion. The structural models, the conformational variation and energy generated by the molecular interactions between PAD4 and the different chemical compounds were validated, using computational tools. This study contributes to the approach of new potential drugs for the treatment of Rheumatoid Arthritis.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Peptidyl Arginine Deiminase, Chemical compounds, *In silico*, Molecular Dynamics Simulation.

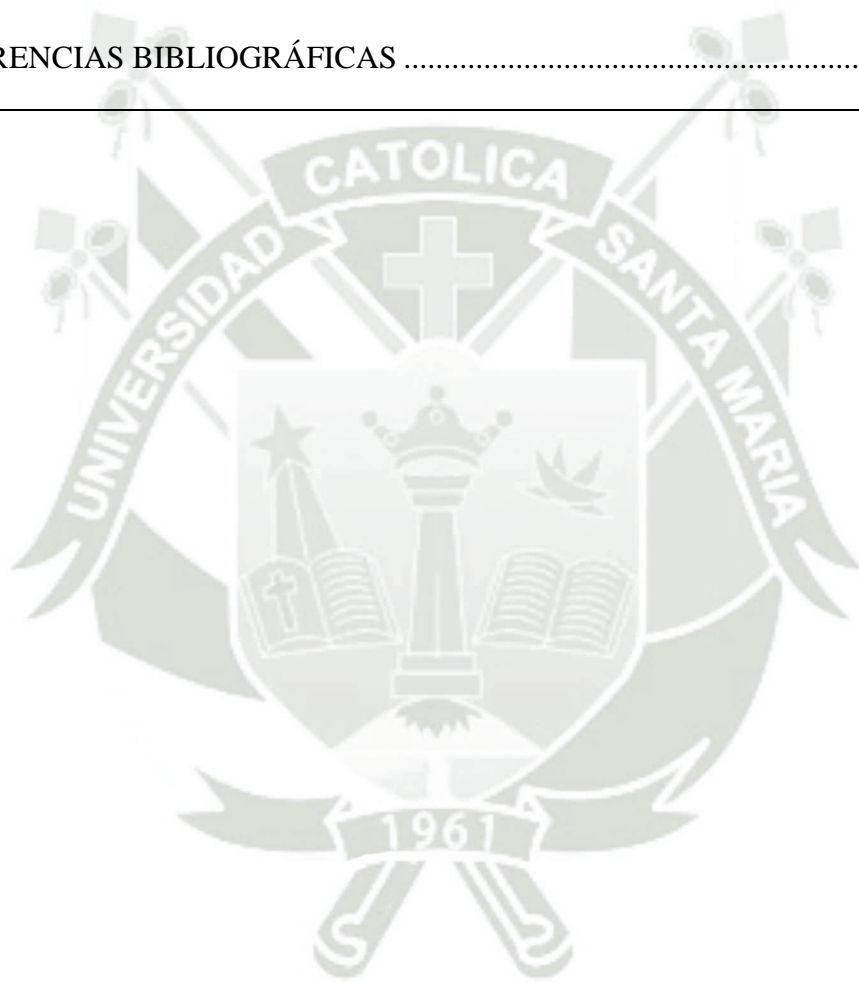
ÍNDICE

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO TEÓRICO	3
1. Planteamiento Teórico.....	4
1.1. Problema de Investigación	4
1.1.1. Enunciado del Problema	4
1.1.2. Descripción del Problema.....	4
1.2. Justificación del Problema	7
1.2.1. Justificación Científica	7
1.2.2. Justificación social.....	7
1.2.3. Contemporánea.....	7
1.2.4. Originalidad	7
1.2.5. Factibilidad	8
1.2.6. Justificación personal.....	8
2. Objetivos	8
2.1. Objetivo General.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. Marco conceptual	9
3.1. Artritis Reumatoide.....	9
3.1.1. Definición	9
3.1.2. Epidemiología.....	9
3.1.3. Factores de Riesgo	9
3.1.4. Fisiopatología	11
3.1.5. Clasificaciones de la Artritis Reumatoide.....	15

3.1.6.	Clínica de la Artritis Reumatoide.....	17
3.1.7.	Diagnóstico	18
3.2.	Anticuerpos	19
3.3.	Patogénesis de los ACP en la Artritis Reumatoide	21
3.3.1.	Desarrollos de inmunocomplejos en espacio sinovial	24
3.3.2.	Interacciones entre ACPA y células residenciales sinoviales	26
3.3.3.	Los ACPA inducen la destrucción de las articulaciones al reaccionar de formacruzada con las fibras de colágeno tipo II.....	26
3.3.4.	Potencial de los enfoques terapéuticos dirigidos a los ACPA para pacientes conArtritis Reumatoide	27
3.3.5.	Rol de la Peptidil Arginina Deiminasa Tipo 4 en los ACPA y la Artritis Reumatoide.....	28
3.3.6.	Potencial Terapéutico de la Peptidil Arginina Deiminasa Tipo 4.....	29
3.4.	Tratamiento	29
3.5.	Bioinformática	30
3.5.1.	Definición	30
3.5.2.	Herramientas computacionales	30
3.5.3.	Diseño, obtención y modelamiento de proteínas	31
3.5.4.	Mecánica Molecular y Dinámica Molecular	32
3.5.5.	Análisis bioinformático.....	33
3.5.6.	Bioinformática clínica.....	33
3.5.7.	Acoplamiento proteína-Ligando (Docking)	33
3.5.8.	Validación de estructuras.....	33
3.6.	Análisis de antecedentes investigativos.....	34
3.6.1.	A nivel internacional.....	34
4.	Hipótesis.....	41
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS		42

1.	Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación.....	43
1.1.	Técnicas	43
1.1.1.	Obtención y Preparación de las Estructuras	43
1.1.2.	Simulación de Dinámica Molecular.....	43
1.1.3.	Análisis de la Dinámica Molecular	44
1.1.4.	Predicción de la Drogabilidad.....	44
1.1.5.	Acoplamiento Molecular	44
1.1.6.	Validación de Estructuras	44
1.2.	Instrumentos.....	45
1.2.1.	Software.....	45
1.2.2.	Servidores	45
1.3.	Materiales de verificación.....	46
2.	Campo de Verificación.....	47
2.1.	Ámbito	47
2.2.	Temporalidad	47
2.3.	Unidades de estudio	47
2.3.1.	Criterios de selección.....	47
3.	Estrategias de Recolección de Datos.....	47
3.1.	Organización	47
3.2.	Recursos.....	48
3.2.1.	Humanos	48
3.2.2.	Institucionales	48
3.2.3.	Materiales	48
3.2.4.	Financieros.....	48
3.3.	Validación de instrumento	48
3.4.	Criterios Éticos.....	48

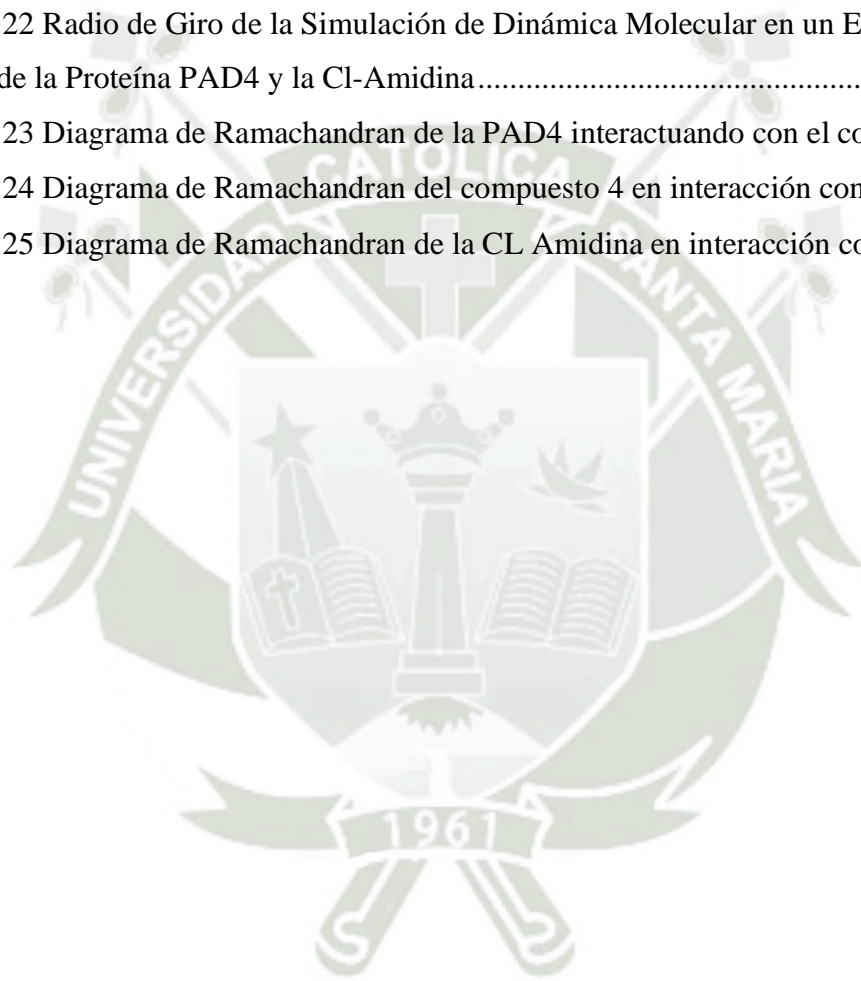
CAPÍTULO III RESULTADOS	49
1. Estructuras Moleculares	50
2. Análisis de la Dinámica Molecular	55
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIONES.....	78
RECOMENDACIONES	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Desarrollo y progresión de la AR.....	12
Figura 2 Mecanismos involucrados en la iniciación y progresión de la AR.....	13
Figura 3 Criterios de clasificación convencionales y nuevos para la AR.....	16
Figura 4 Estructura Terciaria de la PAD4 al finalizar la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT	50
Figura 5 Estructura Cuaternaria de la PAD4 y el Compuesto 2 al finalizar la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT	52
Figura 6 Estructura Cuaternaria de la PAD4 y el Compuesto 4 al finalizar la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT.....	53
Figura 7 Estructura Cuaternaria de la PAD4 y la Cl-Amidina al finalizar la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT	54
Figura 8 RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de la Proteína PAD4.....	55
Figura 9 RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de los compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina).....	56
Figura 10 RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y el compuesto 4	57
Figura 11 RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y el Compuesto 2	58
Figura 12 RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y la Cloramidina	59
Figura 13 RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de la Proteína PAD4	60
Figura 14 RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de los compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina).....	61
Figura 15 RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y el Compuesto 4	62
Figura 16 RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y el Compuesto 2	63
Figura 17 RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y la Cl- Amidina	64
Figura 18 Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensemble NPT a	

100ns de la Proteína PAD4.....	65
Figura 19 Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de los compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina)	66
Figura 20 Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y el Compuesto 2.....	67
Figura 21 Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y el Compuesto 4.....	68
Figura 22 Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y la Cl-Amidina.....	69
Figura 23 Diagrama de Ramachandran de la PAD4 interactuando con el compuesto 2.....	70
Figura 24 Diagrama de Ramachandran del compuesto 4 en interacción con la PAD4.....	71
Figura 25 Diagrama de Ramachandran de la CL Amidina en interacción con la PAD4.....	72



INTRODUCCIÓN

La Artritis Reumatoide (AR) es la artritis inflamatoria sistémica más comúnmente diagnosticada, que se caracteriza por ser crónica y degenerativa; cuya etiología es multifactorial, la cual afecta a la membrana sinovial de las articulaciones. Dicha patología si no es tratada a tiempo lleva a una destrucción de tipo irreversible de las articulaciones afectadas y una incapacidad temprana perjudicando el desarrollo del ser humano (1,2).

La prevalencia mundial de la AR es del 0,24 %. Un estudio reciente realizado en Perú estima una prevalencia de AR de 0.51%. A nivel mundial la AR se clasificó como la 42ª enfermedad con mayor contribución a la discapacidad global (3).

La AR es una enfermedad de tipo autoinmune de etiología múltiple (2). Estudios previos han encontrado una actividad muy importante y específica de autoanticuerpos frente a péptidos citrulinados (ACPA) para la AR, llamada Citrulinación; la cual es una conversión de la arginina en citrulina catalizada por la Peptidil Arginina Deiminasa (PAD), durante este proceso se modifica significativamente la estructura, estabilidad y función de las proteínas, por lo cual puede estar directamente relacionado con la patogenia de la AR. De hecho, la PAD tipo 4 vincula la citrulinación, inflamación y autoinmunidad, que contribuye al desarrollo de muchas enfermedades no infecciosas como la AR, el Lupus Eritematoso Sistémico, incluso el cáncer (4).

Debido al papel fundamental que tiene la PAD4 en el desarrollo de la AR, en los últimos años se han estudiado diversos inhibidores frente a esta proteína; sin embargo, existen limitaciones en el estudio de éstos por lo que todavía no es plausible el desarrollo de un fármaco basado en la interacción de la PAD4 (5,6).

La bioinformática mediante simulaciones computacionales permite encontrar y desarrollar fármacos en menor tiempo y costo, especialmente en la fase de descubrimiento, donde tienen una gran utilidad en el estudio detallado del comportamiento químico y eventos que puedan suceder en los sistemas de interacción molecular. Asimismo, tiene una gran relevancia en evaluar los cambios estructurales luego del acoplamiento de las moléculas, identificando posibles mecanismos de acción del fármaco (7).

Los tratamientos usados en la AR en la actualidad tienen el objetivo de reducir la cascada inflamatoria, además de atenuar el sistema inmune. Cabe resaltar que no existe hasta el momento un tratamiento que se encargue de regenerar el cartílago perdido en estos episodios inflamatorios lo que cataloga este daño como irreversible, por lo que uno de los objetivos

de los últimos trabajos de investigación es la detección temprana de la enfermedad y un tratamiento que se encargue de detener la cascada inflamatoria (4). Estos tratamientos combinan el uso de antiinflamatorios no esteroideos acompañados en algunos casos con el uso de corticoides, llegando a ser necesarios el uso de inmunosupresores, además de corticoides en dosis muy altas con el fin de disminuir la respuesta inmune. Como parte del tratamiento también es considerado el uso de medicamentos de tipo biológico, es decir los anticuerpos monoclonales, previa evaluación del paciente; dicho tratamiento posee contraindicación absoluta en pacientes con cánceres latentes o infección por tuberculosis (5).

Por lo tanto, es crucial el desarrollo de nuevos fármacos en base a las distintas vías fisiopatológicas descubiertas como es la PAD4 y su rol en la producción de AntiCCP. En el presente trabajo de investigación se examinaron 3 compuestos de origen sintético como posibles inhibidores de la PAD4, así como el comportamiento de dicha proteína en su estado normal comparando la interacción molecular de la referida proteína con cada inhibidor. Mediante el uso de herramientas computacionales, las cuales nos permite comparar diversos parámetros que abarca su estructura primaria y las medidas de dispersión que conlleva a dilucidar el comportamiento del péptido y de cada compuesto, lo cual puede brindar las bases de un nuevo tratamiento de la AR altamente potente, incluso puede abrir nuevas vías de investigación con el fin de mejorar el tratamiento de la AR por medio del desarrollo de potenciales fármacos en un futuro mediano.



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. Planteamiento Teórico

1.1. Problema de Investigación

1.1.1. Enunciado del Problema

Evaluación in silico de interacciones de compuestos de origen sintético sobre la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 en el tratamiento para la Artritis Reumatoide.

1.1.2. Descripción del Problema

1.1.2.1. Área del Conocimiento

Área general : Ciencias de la Salud

Área específica : Medicina Humana

Especialidad : Ingeniería Biomédica Computacional

Línea : Reumatología

1.1.2.2. Análisis de Variables

	Variable	Indicador	Unidad / Categoría	Escala
Obtención de estructuras	Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta de razón
	Compuesto 2 4SC SC100288	Presencia de compuesto	Residuos (molécula)	Cuantitativa discreta de razón
	Compuesto 4 4SC SC97362	Presencia de Compuesto	Residuos (molécula)	Cuantitativa discreta de razón
	Cl-Amidina	Presencia de Compuesto	Residuos (molécula)	Cuantitativa discreta de razón

Simulación de dinámica molecular	Número de moléculas	Presencia de moléculas	Átomos	Cuantitativa discreta de razón
	Volumen	Volumen de distribución	L/kg	Cuantitativa continua de razón
	Temperatura	Directo	Grados Celsius (C°)	Cuantitativa continua de intervalo
	Tiempo de optimización	Directo	Nanosegundos (ns)	Cuantitativa discreta de razón
Análisis de las interacciones moleculares	Desviación de la raíz cuadrada media	RMSD (root-mean-square deviation)	RMSD (nm)/ Tiempo (ps)	Cuantitativa continua de razón
	Fluctuación cuadrática media	RMSF (root-mean-square fluctuation)	RMSF (nm)/ residuos (aminoácidos)	Cuantitativa continua de razón
	Radio de giro	Distancia del radio de giro	Radio de giro (nm)/Tiempo (ps)	Cuantitativa Continua de razón
	Sitios activos	Presencia de sitios activos	Número de sitios activos	Cuantitativa discreta
	Interacciones de Van-der-Waals	Energía atómica de contacto	Kcal/mol ⁻¹ – kJ/mol ⁻¹	Cuantitativa continua de razón

	Número de residuos de la región favorecida	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Número de residuos de la región permitida	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta

Número de residuos de la región atípica	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
Calidad general del modelo estructural	Directo	Z-Score	Cuantitativa continua de intervalo

1.1.2.3. Interrogantes Básicas

- ¿Cuál es la capacidad estructural y estabilidad molecular de la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 (PAD4); tras la interacción con sus compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina), mediante simulación de dinámica molecular?

1.1.2.4. Tipo de Investigación

Investigación analítica experimental

1.1.2.5. Diseño de Investigación

Experimental

1.1.2.6. Nivel de Investigación

Nivel experimental in silico exploratorio

1.2. Justificación del Problema

1.2.1. Justificación Científica

Es ya conocida la actividad de Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 (PAD4) , la cual vincula la citrulinación, la inflamación y la autoinmunidad por su papel en la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) (4).

Por lo tanto, dado el papel fundamental que tiene PAD4 en la regulación transcripcional y la patogénesis de la AR, muchos trabajos de investigación han intentado desarrollar inhibidores de PAD4 para facilitar la regresión de la Artritis Reumatoide, sin lograr aún el desarrollo de un fármaco potente. En consecuencia, el presente estudio busca demostrar mediante dinámica molecular la capacidad inhibidora de los compuestos de origen sintético de la PAD4 y evaluar su interacción con la proteína responsable de la citrulinación.

1.2.2. Justificación social

La Artritis Reumatoide es la enfermedad reumática que causa mayor discapacidad, la cual si no es tratada oportunamente puede desencadenar la postración total del paciente, por lo cual es importante el diagnóstico oportuno y el estudio de objetivos terapéuticos con mayor efectividad y especificidad (1).

1.2.3. Contemporánea

Durante la pandemia por enfermedad por coronavirus-2019 (COVID-19), hubo varias barreras para el diagnóstico, tratamiento, adherencia a la medicación en pacientes con artritis reumatoide, asimismo la investigación en reumatología se vio afectada. Si bien la peor fase de la pandemia de COVID-19 podría haber terminado, las lecciones aprendidas y el empleo de nuevos tipos de estudio podrían mejorar aún más la calidad de la investigación en reumatología y brindar preparación para la sostenibilidad de la investigación durante futuras pandemias (5).

1.2.4. Originalidad

El presente estudio busca fomentar el estudio de nuevos fármacos como tratamiento de Artritis Reumatoide, con mayor respuesta y más específicos, mediante el desarrollo de nuevos inhibidores y la evaluación de sus interacciones en el medio.

1.2.5. Factibilidad

El estudio de la capacidad inhibidora de los compuestos de origen sintético y su interacción es posible gracias al uso de dinámica molecular mediante herramientas computacionales bioinformáticas, las cuales han tomado mayor prevalencia en el contexto de la pandemia por COVID-19.

1.2.6. Justificación personal

En lo personal, mediante la presente investigación pretendemos fomentar nuevos estudios sobre reumatología y bioinformática, e impulsar el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de Artritis Reumatoide.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar in silico el mecanismo molecular de los nuevos inhibidores de la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 en el tratamiento de la artritis reumatoide.

2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad de inhibición de los compuestos de origen sintético de la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 para determinar la naturaleza de su interacción con los potenciales inhibidores en el tratamiento de Artritis Reumatoide, mediante herramientas computacionales.
- Minimizar y optimizar las estructuras de la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4, inhibidores (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina) mediante herramientas bioinformáticas.
- Analizar los sitios activos para los compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina).

3. Marco conceptual

3.1. Artritis Reumatoide

3.1.1. Definición

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica crónica que afecta principalmente a las articulaciones, pero también puede manifestarse con características extraarticulares (9). Dada la presencia de autoanticuerpos, como el reumatoide (FR) y anticuerpo anti-proteína citrulinada (ACPA), evaluado como péptido citrulinado anticíclico (antiCCP), que puede preceder a la manifestación clínica de AR por muchos años (5), la AR se considera una enfermedad autoinmune. La autoinmunidad y la carga inflamatoria sistémica y articular impulsa la progresión destructiva de la enfermedad (10).

3.1.2. Epidemiología

La AR afecta alrededor del 1% de la población mundial (11,12). En nuestro país se diagnostican más de 100 nuevos casos de Artritis Reumatoide por año. Puede presentarse a cualquier edad, sin embargo, el riesgo de AR aumenta con los años con una incidencia máxima entre los 40 y 60 años (13). La enfermedad afecta predominantemente a las mujeres (1,14). Predomina en el sexo femenino en una proporción de 3:1 en relación con el sexo masculino (14,15).

3.1.3. Factores de Riesgo

Ser mujer es el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad. Debido a que las mujeres corren un mayor riesgo que los hombres, los factores reproductivos y menopáusicos pueden desempeñar un papel (16). Los estudios actuales informan una disminución reciente en el número de pacientes mujeres, un hallazgo posiblemente relacionado con el mayor uso de anticonceptivos orales que pueden tener un efecto protector (17).

Dentro de los factores de riesgo ambientales, fumar es el factor de riesgo ambiental predominante y duplica el riesgo de desarrollar artritis reumatoide. Su efecto está relacionado a pacientes con la enfermedad Anticuerpo antipéptido citrulinado positivo. Aunque desde el punto de vista patogénico es muy

importante, a nivel poblacional, el riesgo es demasiado bajo para ser clínicamente relevante (12).

Otros factores de riesgo ambientales potenciales incluyen el Índice de Masa Corporal (IMC), la ingesta baja de alcohol, la ingesta de café, el estado de la vitamina D, la mala salud dental, y el nivel socioeconómico bajo, aunque la evidencia que respalda estos otros factores es débil (12,16).

Tener un familiar afectado triplica el riesgo personal; sin embargo, la mayoría de los pacientes con AR no tienen antecedentes familiares. FR y ACPA pueden detectarse en el suero varios años antes del inicio, y su presencia aumenta notablemente el riesgo posterior de AR (18). Existe una predisposición genética a padecer la enfermedad. Así lo indica la tendencia a la agregación familiar y la asociación significativa con el HLA-DR4 en el 70% de los pacientes (19).

Las manifestaciones tempranas de la enfermedad, como el reumatismo palindrómico (episodios autolimitados intermitentes de artritis inflamatoria con períodos prolongados de remisión), aumentan en gran medida el riesgo de progresión a AR (16).

Una hipótesis propone que *Porphyromonas gingivalis* (una bacteria que se encuentra con frecuencia en la periodontitis) promueve la citrulinación aberrante y provoca una ruptura local de la tolerancia a los péptidos citrulinados a través de la expresión endógena de su PAD4, que convierte la arginina en citrulina (19,20).

De hecho, otros agentes infecciosos (por ejemplo, *Proteus Mirabilis*, Se ha sugerido que *Escherichia Coli* y el virus de *Epstein Barr* desencadenan la artritis reumatoide, generalmente a través del mimetismo molecular; sin embargo, estos mecanismos propuestos aún no han sido comprobados (21).

3.1.4. Fisiopatología

Está descrito que la enfermedad reumatoide es el resultado de la acción de un antígeno en un individuo que tiene una base genética predisponente. La naturaleza del factor desencadenante es desconocida; podría tratarse de un antígeno exógeno o de un autoantígeno (22,23).

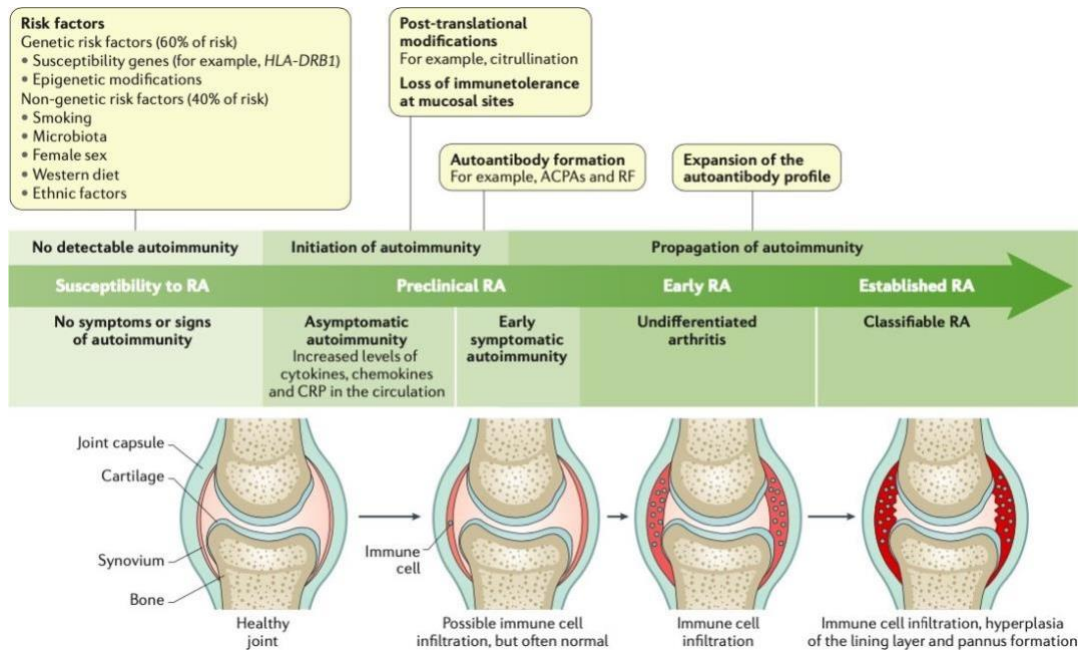
Tanto los factores de riesgo genéticos como los no genéticos contribuyen a la artritis reumatoide (AR), y es probable que se requieran múltiples factores de riesgo antes de alcanzar un umbral por encima del cual se desencadena la AR (24).

3.1.4.1. Artritis Reumatoide Preclínica.

En la mayoría de los pacientes, la patogenia de la AR comienza años antes de que la enfermedad clínica sea evidente, aunque también es posible un inicio agudo que refleje una perturbación inmunitaria inmediata (25). Por lo tanto, se considera que la AR es una enfermedad que comienza con una etapa de alto riesgo o susceptibilidad que se basa principalmente en factores genéticos y avanza a través de la fase preclínica antes de que se desarrolle la inflamación articular (AR temprana) (24).

Los factores ambientales operan a través de esta fase. En última instancia, la AR establecida se desarrolla en aquellos que no se han resuelto por sí mismos (Figura 1). Se cree que los mecanismos discretos operan a lo largo de este continuo patológico, creando oportunidades para intervenciones específicas del estadio y del individuo que podrían anular o incluso prevenir la enfermedad establecida (23,24).

Figura 1
Desarrollo y progresión de la AR

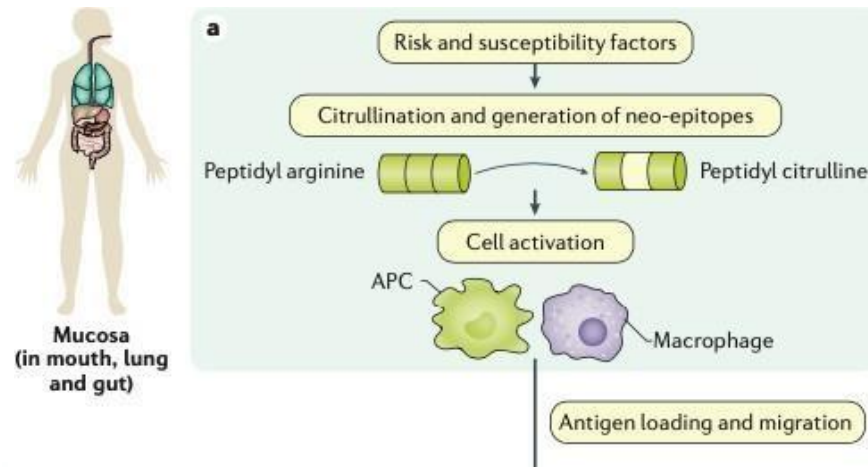


Fuente: Venrooij; Pruijn, (24).

El desarrollo de la AR está determinado por un genotipo predisponente sobre el cual operan factores ambientales y genéticos para finalmente dar como resultado la respuesta sinovial inflamatoria y destructiva (Figura. 2). La forma en que los factores de riesgo ambientales contribuyen a la enfermedad no se comprende por completo. Sin embargo, parece que los factores estresantes, por ejemplo, el humo del cigarrillo pueden actuar sobre las células en los sitios de la mucosa y promover la conversión postraduccional del aminoácido arginina a citrulina en una variedad de proteínas, incluidas las proteínas intracelulares (como las histonas) y proteínas de la matriz (por ejemplo, fibronectina, colágeno, fibrinógeno, enolasa y vimentina) a través de la inducción de peptidil arginina deiminasa en un proceso llamado citrulinación (FIG. 2a) (24).

La citrulinación también puede ser inducida por la microbiota: *P. gingivalis*, que es común en la enfermedad periodontal, expresa PAD y puede inducir la citrulinación y, por lo tanto, promover la generación de ACPA (24). Además, *A. actinomycetemcomitans*, que produce una toxina que aumenta la entrada de calcio en los neutrófilos, puede provocar la citrulinación de péptidos y recientemente se ha implicado en la etiología de la AR (25).

Figura 2

Mecanismos involucrados en la iniciación y progresión de la AR.

Fuente: Venrooij; Pruijn, (24).

Después de la citrulinación, los péptidos alterados se unen a los heterodímeros de la proteína MHC, especialmente a los que contienen el epítipo compartido, lo que conduce a la presentación del antígeno a las células T, que a su vez estimulan a las células B para sintetizar una gama de anticuerpos que reconocen autoproteínas, (FIG. 2b). Curiosamente, este proceso podría considerarse una respuesta inmunitaria normal a un antígeno alterado en lugar de una verdadera autoinmunidad (24,26).

La presencia de ACPA circulantes, citocinas y quimiocinas proinflamatorias circulantes puede detectarse hasta 10 años antes del inicio de la enfermedad clínica, lo que apunta a la activación inmunitaria durante el período preclínico. La presencia de ACPA, se asocia con un curso de la enfermedad más agresivo y, por lo tanto, puede usarse no solo como marcador de diagnóstico sino también como marcador de pronóstico (24,27). Los ACPA son heterogéneos, pero su fina especificidad (es decir, el perfil exacto de reconocimiento de péptidos) no parece predecir el curso clínico (28). Sin embargo, las muestras de biopsia sinovial de individuos positivos para autoanticuerpos suelen ser normales, incluso en presencia de artralgia (29), aunque también se puede encontrar infiltración sinovial con células inflamatorias en ausencia de signos y síntomas clínicos. La presencia de ACPA por sí sola no es suficiente para causar sinovitis; Es probable que se requiera un mecanismo adicional (por ejemplo, formación de complejos

inmunitarios, activación del complemento o daño microvascular) para iniciar la sinovitis clínica caracterizada por un aumento de la permeabilidad vascular y la entrada de células inflamatorias en el sinovio (24,30).

3.1.4.2. Artritis Reumatoide Fase temprana y Fase establecida

La AR temprana se caracteriza por una inflamación sinovial basada en la infiltración de células mononucleares, dominada por células T CD4+ y macrófagos, junto con una activación temprana de células del estroma. Han surgido algunos estudios recientes al comparar la enfermedad temprana con la enfermedad establecida. La mayoría de los datos sugieren que las vías patogénicas en la membrana sinovial se establecen temprano y permanecen notablemente estables durante los años siguientes, aunque se han informado algunas diferencias (24).

La AR temprana a veces se describe como una "ventana de oportunidad" por estas razones⁸⁴. Por lo general, el perfil de ACPA se expande antes del inicio de la enfermedad clínica, mientras que el rango de especificidades no evoluciona más con la progresión a la enfermedad establecida, de acuerdo con un papel patogénico temprano para estos autoanticuerpos (24, 26).

Las células T a veces pueden exhibir clonalidad en las primeras etapas de la enfermedad, pero se vuelven mucho más policlonales, tal vez a través de la dilución, a medida que la enfermedad evoluciona, lo que significa que la detección de las células T que causan la enfermedad en la enfermedad establecida es un desafío. Finalmente, el papel de los macrófagos y fibroblastos en la perpetuación de la sinovitis es más prominente en la enfermedad establecida. Los patrones de metilación del ADN en FLS aislados de individuos con AR temprana difieren de los de individuos con enfermedad establecida; El análisis de la vía mostró que las principales diferencias se encuentran en la diferenciación, adhesión y proliferación celular (24,31).

3.1.5. Clasificaciones de la Artritis Reumatoide

El Colegio Americano de Reumatología (ACR) y La Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) desarrolló criterios de clasificación para la AR para identificar pacientes con enfermedad temprana, antes de que el daño en la articulación sea irreversible (16).

De acuerdo con este sistema de clasificación, la AR requiere la presencia de sinovitis en al menos una articulación y ausencia de una explicación clínica más probable. Tres factores clave indican AR probable en lugar de una poliartritis autolimitada: artritis simétrica de articulaciones pequeñas, presencia de ACPA o FR (particularmente en títulos más de 3 veces el límite superior de lo normal) y síntomas que duran más de 6 semanas (10,16).

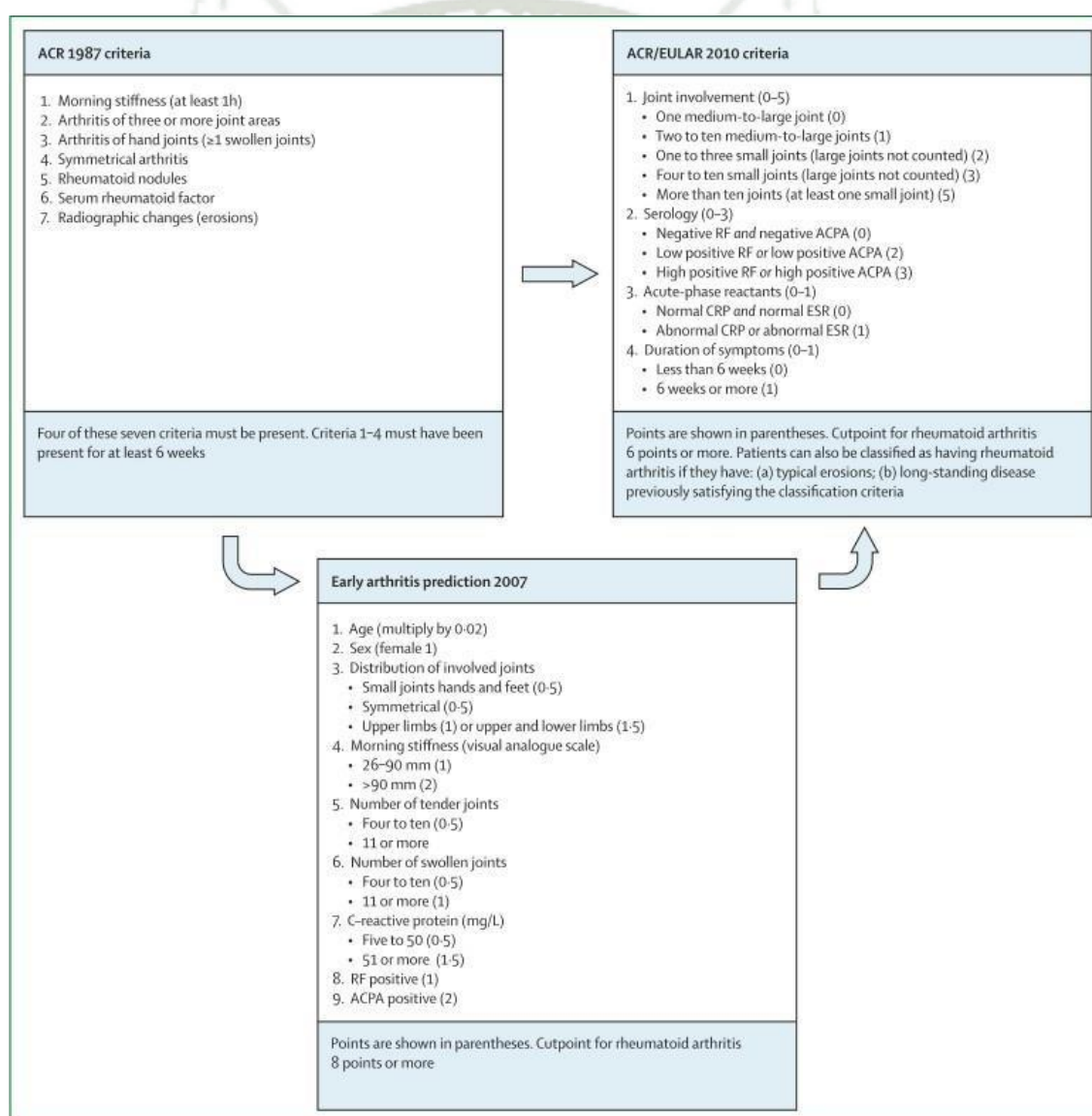
Los criterios ACR/EULAR de 2010 han tenido éxito en la inscripción de pacientes en estudios de investigación para la prevención de la AR o la AR temprana diagnosticada antes de la aparición de complicaciones prolongadas (10). Sin embargo, los pacientes de atención clínica que tienen AR pueden requerir tratamiento a pesar de no cumplir con estos criterios de clasificación. Por ejemplo, un paciente con monoartritis crónica de rodilla, títulos altos de FR y ACPA, y niveles elevados de reactantes de fase aguda puede recibir tratamiento para la AR incluso si no cumple con los criterios (16).

Se desarrollaron para clasificar a los pacientes con manifestaciones articulares de la enfermedad y es posible que no se apliquen a los pacientes que presentan manifestaciones extraarticulares predominantes, como Enfermedad Pulmonar Intersticial sin afectación articular evidente (10). Por lo tanto, los médicos deben usar su mejor juicio al decidir si diagnosticar y tratar la AR y considerar la consulta de expertos para casos ambiguos.

En la figura 3 los criterios ACR 1987 se diseñaron para clasificar la artritis reumatoide establecida. Los criterios ACR/EULAR de 2010 están destinados a clasificar tanto la enfermedad temprana como la establecida. Los modelos de predicción como el modelo de Van Der Helm representan una fase intermedia; se diseñaron para identificar a los pacientes con artritis indiferenciada temprana que tienen más probabilidades de cumplir posteriormente los criterios de AR; tales modelos son algo más complejos que los nuevos criterios (10).

Los criterios de clasificación revisados últimamente pueden funcionar mejor que algunos criterios de clasificación más antiguos en términos de sensibilidad y/o especificidad con el uso de mejores conjuntos de datos y metodología. Los perfiles de riesgo-beneficio más favorables de las terapias y el reconocimiento de que la terapia temprana puede afectar el pronóstico a largo plazo han impulsado ensayos en personas con enfermedades reumáticas que aún no alcanzan los umbrales para la clasificación tradicional (32).

Figura 3
Criterios de clasificación convencionales y nuevos para la AR



Fuente: Aletaha et al, (10).

Por lo tanto, algunos criterios de clasificación recientes se han centrado más en mejorar la sensibilidad de los criterios. Por ejemplo, se creía que los criterios de AR del ACR de 1987 no detectaban la enfermedad temprana (falta de sensibilidad), lo que condujo al desarrollo de nuevos criterios de AR de 2010 (mejor sensibilidad) para que pudiéramos identificar a los pacientes de forma temprana para estudios de intervención (10).

Sin embargo, se debe considerar que esto puede aumentar la posibilidad de falsos positivos en ausencia de pruebas estándar de oro, y probablemente tenga implicaciones para las estimaciones de prevalencia de estas enfermedades, así como para las prácticas clínicas. Por otro lado, la falta de suficiente especificidad en los criterios (falsos positivos) también influye en la inscripción de pacientes en ensayos de agentes con seguridad poco clara: perfiles de eficacia; como resultado, algunos criterios de clasificación recientes han tenido como objetivo mejorar la especificidad (32).

3.1.6. Clínica de la Artritis Reumatoide

3.1.6.1. Manifestaciones Articulares

La evaluación en la artritis reumatoide analiza principalmente la inflamación de las articulaciones. Las revisiones médicas incluyen recuentos de articulaciones aumentadas de tamaño y dolorosas y evaluación global (es decir, estimaciones generales de la actividad de la enfermedad y el estado de salud). Los recuentos estándar de articulaciones se centran en 28 articulaciones de las manos, las extremidades superiores y las rodillas; las articulaciones de los pies, aunque importantes, se omiten. Algunos expertos prefieren conteos extendidos de 66 y 68 articulaciones, que incluyen los pies (12).

Las medidas de laboratorio abarcan la velocidad de sedimentación de eritrocitos, la proteína C reactiva o ambas. Las medidas basadas en el paciente evalúan el dolor, la evaluación global y la discapacidad. El cuestionario de evaluación de la salud (HAQ) mide la discapacidad. Los pacientes registran otras áreas relevantes, como fatiga y depresión. Las medidas basadas en el paciente son especialmente importantes porque miden la perspectiva del individuo sobre la carga de su artritis reumatoide (11,12).

3.1.6.2. Manifestaciones Sistémicas

La AR no afecta exclusivamente a las articulaciones. Como enfermedad sistémica, la AR se asocia con una mayor respuesta de fase aguda y puede provocar una serie de manifestaciones extraarticulares en los ojos, los pulmones, el corazón y otros órganos. En la AR grave pueden observarse nódulos reumatoides y vasculitis, aunque en la actualidad son menos frecuentes. Sin embargo, la enfermedad cardiovascular es común en la AR, e incluso se ha informado que la incidencia de enfermedad pulmonar intersticial ha aumentado con el tiempo. Aunque el aumento de la enfermedad pulmonar intersticial puede atribuirse a una mayor conciencia y cierto sesgo de detección a lo largo del tiempo, la enfermedad pulmonar intersticial es, junto con la enfermedad cardiovascular, una de las manifestaciones extraarticulares más graves de la AR (24). La AR también puede acompañarse de un síndrome de Sjögren secundario; el proceso inflamatorio crónico puede conducir a enfermedad cardiovascular, amiloidosis secundaria y linfoma. La AR también puede ir acompañada de fibromialgia. Las manifestaciones extraarticulares y las complicaciones de la enfermedad pueden atenuarse o reducirse con un tratamiento eficaz (24,25).

3.1.7. Diagnóstico

No existen criterios diagnósticos para la artritis reumatoide. El paciente típico se presenta con articulaciones inflamadas y dolorosas de aparición reciente, rigidez articular matutina y pruebas de laboratorio anormales, como concentraciones elevadas de proteína C reactiva o velocidad de sedimentación de eritrocitos. Desafortunadamente, esta presentación no es específica de la artritis reumatoide. Es necesario considerar otras causas de artritis, como la artritis reactiva, la osteoartritis, la artritis psoriásica, la artritis infecciosa (viral o bacteriana, y en particular la enfermedad de Lyme según la región geográfica), o algunas afecciones autoinmunes más raras, como las enfermedades del tejido conectivo, si hay signos sugestivos adicionales. o los síntomas están presentes (p. ej., erupción cutánea, úlceras bucales, alopecia, fenómeno de Raynaud, síndrome Sicca, anticuerpos antinucleares, enzimas musculares elevadas). De hecho, en muchos pacientes no se puede hacer un diagnóstico específico en la

primera presentación y el diagnóstico de exclusión es artritis indiferenciada (20,33).

Proporcionar dicho diagnóstico preliminar, dejando abierta la evolución futura a un diagnóstico distinto, es importante, porque el tratamiento modificador de la enfermedad está indicado y es necesario para cualquier tipo de artritis inflamatoria crónica (20).

El diagnóstico es clínico y puede estar respaldado por pruebas de laboratorio, por ejemplo: Factor reumatoide, ACPA y estudios de imagen como la presencia de sinovitis en la ecografía y, más adelante en el curso de la enfermedad, erosiones óseas y/o estrechamiento del espacio articular en la exploración mediante rayos X. Los criterios para el diagnóstico incluyen tener al menos una articulación con inflamación definida que no se explica por otra enfermedad. La probabilidad de un diagnóstico de artritis reumatoide aumenta con la cantidad de articulaciones pequeñas involucradas. En un paciente con artritis inflamatoria, la presencia de un factor reumatoide o un anticuerpo anti-proteína citrulinada, o un nivel elevado de proteína C reactiva o velocidad de sedimentación de eritrocitos sugiere un diagnóstico de artritis reumatoide. La evaluación de laboratorio inicial también debe incluir hemograma completo con diferencial y evaluación de la función renal y hepática (22,34,35).

3.2. Anticuerpos

Los anticuerpos anti péptidos citrulina (ACPA), en comparación con el clásico y bien conocido factor reumatoide son detectados aproximadamente en 2/3 de los pacientes con artritis reumatoide tiene una mejor rango de especificidad, La presencia de estos anticuerpos ha sido demostrado que precede a el inicio de los síntomas clínicos por muchos años anticipación y está fuertemente relacionado a un fenotipo de artritis reumatoide de Tipo erosiva, la presencia de dichos anticuerpos está también asociado con las manifestaciones extra articulares incluyendo manifestaciones cardiovasculares y pulmonares (35). Clínicamente, la presencia de estos anticuerpos es relevante para decidir el tratamiento en pacientes con artritis reumatoide Ya sea con rituximab e incluso no hay una fuerte asociación para monitorear la eficacia de metotrexato o inhibidores del factor de necrosis tumoral. Estos anticuerpos fueron descubiertos en el año de 1964 y su reactividad fue

definida en el año de 1998 una vez hecho este descubrimiento el entendimiento de los mecanismos de origen y generación de dichos anticuerpos ha progresado hasta obtener relevancia clínica Incluso se conoce que el humo del tabaco es un compuesto que ocasiona una patogénesis y promueve la activación de la Peptidil Arginina Deiminasa (PAD) generando neo antígenos citrulinados la acumulación de estos antígenos promueven crecimiento de las células B y consecuentemente la producción de estos anticuerpos con la ayuda del antígeno leucocítico humano ocurre una interacción entre estos antígenos y las células B, por su lado la células T y las células presentadoras de antígeno también promueven la formación de dichos anticuerpos (36).

Los posibles efectos biológicos y mecanismos patogénico de cómo los anticuerpos antipeptidos y tornados interactúan con las células del espacio sinovial inducen una inflamación articular se ha ido esclareciendo debido a que esta inflamación promueve la infiltración de muchas células inmunes incluyendo linfocitos macrófagos y neutrófilos además de promover una activación de fibroblastos recidivantes y osteoclastos que contribuyen a la patogénesis de la artritis reumatoide (35,36).

Estos anticuerpos tienen una forma de inmunoglobulina tipo G, son proteínas producidas por las células plasmáticas las cuales reconocen un único antígeno y están subdivididas dentro de diferentes y subtipos de acuerdo a su fragmento cristalizado en isotipo que tiene una mayor especificidad en la reacción inmune. Si bien es cierto los anticuerpos anti-citrulina y el factor reumatoideo son dos auto anticuerpos descubiertos en pacientes con artritis reumatoide y frecuentemente comparten la presencia de anticuerpos en el plasma del paciente con esta enfermedad existen diferentes características que determina su patogénesis y los diferentes roles que desempeña a desencadenar esta enfermedad (37).

Comparado con el factor reumatoideo que es un tipo de inmunoglobulina M los anticuerpos anti citrulina tienen una forma tipo inmunoglobulina G en una globulina, Los linfocitos T CD4 juegan un papel muy importante en la maduración de los anticuerpos anti Citrulina, por otro lado el factor reumatoideo posee una afinidad por las células B sólo tiene determinados centros germinales de reacción, por otro lado todas estas inmunoglobulinas pertenecen a las familias de las glicoproteínas sin embargo en los anticuerpos anti citrulinados se ha descubierto una cadena de N

terminal la cual juega un papel muy importante al momento de la alteración de las funciones de las inmunoglobulinas (38). Los anticuerpos anti péptidos citrulinados consisten en un grupo de anticuerpos que reaccionan a una variedad de antígenos generados a través de la modificación post translocación de la arginina a través de péptidos como la citrulina, varias proteínas candidatas a la citrulinación como la queratina, fibrinógeno, vimentina, fibronectina y alfa enolasa han sido identificadas, sin embargo en el término se asoció a la artritis reumatoide fue introducido recientemente refiriéndose a una colección de más de 100 proteínas sin determinar identificadas en el suero del fluido sinovial de pacientes con las Artritis Reumatoide. Además algunos esfuerzos considerables por medio científicos en los últimos años determinan que no hay una proteína o antígeno dominante sino que son un conjunto de proteínas las cuales van a ser sometidas a este proceso de citrulinación el cual se va a encargar de activar el mecanismo por el cual se produce esta enfermedad (39).

3.3. Patogénesis de los ACP en la Artritis Reumatoide

Varios estudios han documentado la inducción de ACPA y la artrogénica de ACPA en diferentes modelos. La presencia de estos anticuerpos en pacientes se relaciona con una artritis reumatoide más destructiva y la acumulación de péptidos citrulinados en las articulaciones sugiere aún más el posible papel de los ACPA en la patogénica de la AR, varias células inmunitarias y tejidos locales están directamente implicados en el proceso de inflamación articular, abordaremos el tema desde la generación de antígenos citrulinados y las interacciones de los ACPA con los mediadores inmunes relacionados con la AR, así como la estructura sinovial. Aunque las proteínas citrulinadas se conocen como objetivos para los ACPA en la patogénica de la AR, la citrulinación en sí no es un proceso patogénico sino fisiológico que está involucrado en desarrollo cerebral, apoptosis, diferenciación epidérmica y modulación de la cromatina. La citrulinación es un proceso que depende del calcio y requiere un entornoreductor para una actividad eficiente (40).

Los productos de las reacciones enzimáticas de PAD tienen una mayor hidrofobicidad de las proteínas y una proteína alterada. Sin embargo, cuando se produce una citrulinación excesiva más allá de la regulación fisiológica, los péptidos citrulinados resultantes pueden potencialmente convertirse en neoantígenos para alimentar la generación secuencial de ACPA y servir como objetivos vinculantes (38,40).

La acumulación de proteínas citrulinadas intracelulares y extracelulares en las articulaciones sugiere un trastorno de citrulinación en pacientes con Artritis Reumatoide, es necesario tener en cuenta como los estímulos ambientales y las vías de muerte celular de diversas formas, se han sugerido para promover la generación de autoantígenos citrulinados en la AR, como se analiza a continuación (36,40).

El tabaquismo y la virulencia microbiana local son los dos principales factores de riesgo ambiental desencadenando la generación de ACPA en pacientes con Artritis Reumatoide, también se encontró que el tabaquismo está relacionado a una mayor expresión de PAD, lo que lleva a una mayor citrulinación en el organismo, al ocurrir la acumulación de antígenos citrulinados se desencadenan fuertes agentes inmunológicos proporcionados por los agentes virulentos dentro del humo también pueden atraer y activar células dendríticas y células B para la producción secuencial de anticuerpos (40).

La infección por bacterias que causan periodontitis, como *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, así como la microbiota intestinal, probablemente contribuyen a la patogenia de la Artritis Reumatoide asociada a ACPA. Los formadores de poros bacterianos como la ionomicina y la calcimicina de las especies de *Streptomyces* y la leucotoxina A de *Aggregatibacter* son importante para desencadenar la entrada de calcio y generar epítomos neocitrulinados no tolerados. La citrulinación en la periodontitis relacionada con *P. gingivalis* funciona a través de diferentes mecanismos. La *P. gingivalis* es un patógeno capaz de citrulinar péptidos en un patrón único debido a la expresión de su propio PAD. Sin embargo, debido a la falla en el estudio de la reconocibilidad real de *P. gingivalis* de Péptidos PAD- citrulinados por ACPA humana, las conclusiones definitivas en cuanto a la periodontitis inducida por *P. gingivalis* en la patogenia de la Artritis Reumatoide asociada a ACPA no se puede alcanzar de acuerdo con la actual datos disponibles. Curiosamente, De Aquino y otros han demostrado que la artritis inducida por *P. gingivalis* depende en gran medida de la expansión y activación de Th17, posiblemente a través de TLR y IL-1. La salida de PAD activos transitoriamente en el entorno y la generación de proteínas citrulinadas de novo son algunos de los posibles mecanismos relacionados con vías de muerte celular. Específicamente, se ha demostrado que la autofagia conduce a la

citrulinación de - enolasa y vimentina en monocitos y sinoviocitos similares a fibroblastos (42,43).

Las proteínas son objetivos conocidos para los ACPA, y el nivel de marcadores de autofagia está bien correlacionado con el aumento de títulos de ACPA, Tal noción también está respaldada por la reducción sincronizada de la autofagia y niveles de proteínas citrulinadas en pacientes con AR en tratamiento. Además, aunque todavía no está claro si el mecanismo de la NETosis crea citrulinación patógena o simplemente redistribuye un citrulinoma existente, se ha demostrado la liberación extracelular de autoantígenos citrulinados para desencadenar la artritis asociada a ACPA. Como se mencionó anteriormente, las bacterias contribuyen al daño celular y da como resultado una citrulinación excesiva lo cual promueve vías de muerte celular que incluyen autofagia, NETosis y una muerte de neutrófilos distinta, se cree que es por leucotóxico e hipercitrulinación los cuales están implicados en la generación de autoantígenos citrulinados y en la inducción del desarrollo de ACPA en sujetos susceptibles (38).

Si la citrulinación no selectiva se desarrolla inadvertidamente es probable que las proteínas neo-citrulinadas que no son toleradas previamente por el sistema inmunitario puedan desencadenar una respuesta autoinmune. Por otro lado, los PAD hiperactivos pueden apuntar a sitios novedosos para reacciones y generar neoepítomos por accidente. Hasta la fecha, se han identificado cinco PAD (PAD1–4 y 6) en humanos. Teniendo en cuenta el enriquecimiento de PAD2 y PAD4 en el tejido y líquido sinovial de la AR, estos dos PAD han ganado la mayor atención en la investigación de la AR. Estudios previos han demostrado que, en comparación con PAD4, PAD2 juega un papel dominante en la citrulinación de fibrinógeno. Sin embargo, cuando es catalizada por PAD4 se reconoció un fibrinógeno distintivo y parcialmente citrulinado por las ACPA. En conjunto, la evidencia actual sugiere que la citrulinación desregulada puede impulsar la generación de neoantígenos para el reconocimiento y la orientación de ACPA en individuos susceptibles propensos a la AR (42,43).

3.3.1. Desarrollos de inmunocomplejos en espacio sinovial

Los complejos inmunes (IC) se forman dentro del espacio sinovial y se depositan en la superficie articular del cartílago los cuales funcionan como mediadores importantes para la activación de los neutrófilos. Como los defectos de los receptores específicos tipo RI atenúan en gran medida la activación de los neutrófilos en presencia de inmunocomplejos, similar pero diferente a la de los macrófagos, particularmente receptores específicos tipo RI y receptores específicos tipo RIII, se ha documentado que desencadena la activación de neutrófilos e inflamación tisular. De hecho, un trabajo reciente elaborado por Kempers y otros documentó que los IC que contienen ACPA IgG1 se unen predominantemente a la activación de Fc γ RI y Fc γ RIIIa, los IC se unen mejor Fc γ RI expresado por activación neutrófilos y la patogénesis de la enfermedad de conducción en la AR. Específicamente, después de la activación de los neutrófilos la destrucción local de cartílago y tejido puede inducirse a través de la desgranulación de neutrófilos y la liberación de enzimas degradantes, así como especies reactivas de oxígeno (ROS). Consecuentemente ello persiste con la activación de receptores y citocinas, la inhibición de la proliferación de condrocitos y la activación de sinoviocitos. La proliferación y la invasión también contribuyen a la lesión articular, así como la generación de quimioatrayentes, tales como IL-8 y leucotrieno B4, amplifican aún más el proceso inflamatorio al reclutar más neutrófilos a la membrana sinovial. Estas características específicas de los neutrófilos al activarse poseen un gran potencial citotóxico en la patogenia de la AR. Aparte de la producción de enzimas degradantes y la iniciación de las citocinas y las quimiocinas en las cascadas de inflamación, la liberación de NET que contienen fibras extracelulares para su replicación se adicionan las proteínas y las enzimas granulares de los neutrófilos que proporcionan una gran fuente para la conducción de autoantígenos. Se descubrió que la NETosis aumentaba en los neutrófilos del líquido sinovial de Artritis Reumatoide y circulación sistémica. En los sueros extraídos de pacientes con Artritis Reumatoide se demostró que aquellos ricos en ACPA estimulan significativamente la NETosis (44).

La liberación de NET además es una fuente de autoantígenos citrulinados, la NETosis también promueve la citrulinación de antígenos dentro del espacio

sinovial. Esto deriva en la autorreactividad y maduración por afinidad de las células B sinoviales. También se observó que la acelerada actividad de PAD y autoantígenos citrulinados externalizados sobre la red de neutrófilos probablemente impulsan más la producción de ACPA. Estos resultados, junto con la capacidad de las ACPA para promover redes de neutrófilos, sugieren un ciclo que se perpetúa a sí mismo que puede resultar en una reactividad autoinmune profunda y continua (45).

Las células B autorreactivas que muestran ACPA en la superficie promueven la diferenciación y la secreción de células T además de Citoquinas proinflamatorias junto con la producción de anticuerpos, las células B autorreactivas logran escapar a la tolerancia central y periférica además sirven como Células Presentadoras de antígeno para promover la maduración y diferenciación de células T en células de memoria las cuales desempeñan un papel crítico en el soporte de estructuras similares a centros germinales dentro de la membrana sinovial inflamada y promueven el proceso autoinmune. Los datos también sugieren que el agotamiento de las células B dificulta la capacidad de las células T para producir interferón-gamma (IFN- γ) e interleucina (IL)-1. Las células T específicas de citrulina aisladas de pacientes con Artritis Reumatoide muestran predominantemente Th1 y Fenotipos Th17 (44).

Mientras que las células Th1 activan los macrófagos para que sirvan como Células Presentadoras de Antígeno y sean la fuente de varias citoquinas proinflamatorias, como IFN- γ , IL-2 y TNF- α , las células Th17 se encargan no solo de estimular la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y metaloproteinasas de matriz en los fibroblastos sinoviales de la Artritis Reumatoide, pero también promueven el crecimiento del pannus, la osteoclastogénesis y la angiogénesis a través de la producción de IL-17. Adicionalmente los subconjuntos de células B de memoria expresan el activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa-B (RANKL), la cual es importante para la regulación de la homeostasis ósea y la osteoclastogénesis. Las células B autorreactivas que expresan ACPA de superficie respaldan de manera crítica la progresión de la AR al encontrar sus antígenos específicos; en este caso, péptidos citrulinados (45,46).

3.3.2. Interacciones entre ACPA y células residenciales sinoviales

En los últimos años, varios informes han mostrado resultados interesantes que explican las dos principales características de la manifestación de Artritis Reumatoide, dolor en las articulaciones y erosión ósea, a través del reconocimiento directo y la unión de la región variable ACPA a dianas celulares en los osteoclastos. Utilizando modelos de artritis murina experimental, los estudios de Wigerblad y Krishnamurthy demostraron que los ACPA enriquecidos a partir de IgG humana puede inducir dolor a través de la liberación de IL-8 y promover la diferenciación de osteoclastos de una manera dependiente de IL-8. Al igual que los macrófagos y las células dendríticas, los osteoclastos también contienen cantidades suficientes de Fc γ R, los FcR en asociación con otras proteínas inmunomoduladoras en la superficie de los osteoclastos son importantes para el desarrollo y la función de los osteoclastos (47).

3.3.3. Los ACPA inducen la destrucción de las articulaciones al reaccionar de forma cruzada con las fibras de colágeno tipo II

Los condrocitos son el componente principal del cartílago articular, secretan componentes de la matriz extracelular compuestos por agua, colágeno tipo II, proteoglicanos, proteínas no colágenas y glicoproteínas que constituyen la mayor parte de la estructura. Se ha demostrado que el colágeno tipo II en pacientes con Artritis Reumatoide se une a los componentes del cartílago y a los antígenos presentados en la superficie del cartílago articular. Recientemente, se documentó que los ACPA reaccionan de forma cruzada con colágeno tipo II, lo que deriva en agotamiento de proteoglicanos y artritis severa, el posible mecanismo puede ser la unión de ACPA con el colágeno tipo II que induce inflamación articular y daño estructural al desencadenar la cascada del complemento (47,48).

3.3.4. **Potencial de los enfoques terapéuticos dirigidos a los ACPA para pacientes con Artritis Reumatoide**

La acumulación de pruebas ha demostrado que los niveles de ACPA pueden no ser biomarcadores ideales para monitorear la eficacia del metotrexato e inhibidores del TNF en la Artritis Reumatoide. Aunque se ha demostrado que rituximab y abatacept controlan la actividad de la enfermedad sin embargo la reducción en el nivel de ACPA es muy limitada. Además, tras el éxito inicial de la respuesta al tratamiento con rituximab, los ACPA no aumentan de nivel antes o durante la recaída después de la respuesta. Si bien los niveles de ACPA pueden no estar correlacionados con la gravedad de los síntomas generales de las articulaciones, dado su potencial patogénico y terapéutico, se están investigando continuamente nuevos métodos dirigidos y reduciendo los niveles de ACPA (48).

Los científicos han identificado dos péptidos derivados de la cadena α del fibrinógeno capaces de alterar el ACPA en la unión al péptido citrulinado anticíclico. Recientemente, los ACPA terapéuticos creados específicamente para atacar los residuos de citrulina en el extremo N-terminal de las histonas 2A y 4 se han probado en diversas enfermedades relacionadas con NET, incluidas las artritis inflamatorias (47).

Aunque no está diseñado específicamente para tratar enfermedades resultantes de la sobreproducción de ACPA, la atenuación de NETosis y procesos inflamatorios secuenciales a través del bloqueo de citrulina es una herramienta útil aplicación referenciada por los mecanismos patogénicos de las ACPA. Finalmente, considerando la importancia de trastornos citrulinados que preceden a la generación de ACPA, los inhibidores de PAD también se investigaron en el tratamiento de la Artritis Reumatoide ACPA positiva. Dado que la seguridad de la inhibición de PAD puede ser un problema potencial, nuevos compuestos capaces de inhibir la citrulinación inducida por PAD4 se están investigando (48).

3.3.5. Rol de la Peptidil Arginina Deiminasa Tipo 4 en los ACPA y la Artritis Reumatoide

La peptidilarginina deiminasa humana 4 (PAD4), una enzima dependiente de calcio previamente conocida por convertir residuos de arginina a citrulina en las histonas, también puede convertir arginina monometilada a citrulina tanto in vivo como in vitro. Su principal función es la citrulinación de residuos de arginina. Esta estructura se encuentra unido a Ca^{2+} en complejo con tres péptidos N-terminales de histonas, cada uno de los cuales consta de 10 aminoácidos que incluyen un residuo de arginina (50).

La enzima induce una conformación doblada similar a un giro compuesto de cinco residuos sucesivos en la superficie molecular cerca la hendidura del sitio activo. Los cinco residuos restantes están muy desordenados. La enzima reconoce cada péptido a través de la columna vertebral. La especificidad de secuencia del péptido reconocido por esta enzima es bastante amplia. Estas observaciones proporcionan conocimientos sobre el reconocimiento de proteínas diana por modificación de histonas enzimas e ilustrar cómo PAD4 puede apuntar a múltiples sitios de arginina en las colas N-terminales de las histonas. Además, la actividad de PAD4 vincula la citrulinación, la inflamación y la autoinmunidad formando trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Los neutrófilos liberan una red de cromatina altamente descondensada de ADN, histonas y una serie de varias proteínas y péptidos que están presentes dentro de los gránulos de neutrófilos (49).

A pesar de ser considerado un mecanismo de defensa, la formación excesiva de NET contribuye al desarrollo de muchas enfermedades no infecciosas, incluyendo AR, lupus eritematoso sistémico, diabetes, aterosclerosis, sepsis, trombosis e incluso cáncer. La PAD4 es esencial para la formación de NET al promover descondensación de la cromatina a través de la citrulinación de histonas, además de la PAD2 y PAD4 humana, la evidencia sugiere que la PAD bacteriana también puede jugar un papel en la patogenia de la AR. Varias especies patógenas de Porphyromonas, incluyendo Porphyromonas gingivalis, la cual produce peptidilarginina deiminasa (PAD), que a diferencia de los mamíferos, se considera un patógeno clave en la periodontitis, una enfermedad similar a la AR que se caracteriza por una inflamación autosostenida crónica.

Por lo tanto, tanto las PAD humanas como sus contrapartes bacterianas pueden presentar una posible diana terapéutica en el tratamiento de la Artritis Reumatoide (49,50).

3.3.6. Potencial Terapéutico de la Peptidil Arginina Deiminasa Tipo 4

Dado el papel fundamental que tiene PAD4 en la regulación transcripcional y patogenia de la AR, se ha intentado desarrollar inhibidores de PAD4 para regular su actividad y facilitar la regresión de la Artritis Reumatoide. En los últimos años, varios inhibidores de PAD han sido descritos, por ahora lo más efectivo son los compuestos irreversibles de haloacetamida, por ejemplo, F- y Cl-amidina, los cuales han demostrado que actúan contra PAD4 in vitro e in vivo. Se ha demostrado que la Cl-amidina reduce los signos y síntomas clínicos de la colitis y disminución de la gravedad de la artritis inducida por colágeno murino (CIA). La mayoría de los inhibidores reversibles como taxol, estreptomina y minociclina son relativamente débiles comparados con la Cl-amidina. Aunque el número de inhibidores de PAD4 disponibles aumentó drásticamente en los últimos años, todavía están lejos de ser un fármaco basado en un mecanismo para PAD4. Por lo tanto, desarrollar nuevos y potentes inhibidores específicos de PAD4 es crucial (50,51).

3.4. Tratamiento

Debido a que la inflamación se encuentra en el ápice de los eventos clínicos (que impulsan los síntomas clínicos, el daño articular, la discapacidad y la comorbilidad), su reversión es el principal objetivo terapéutico; si la inflamación cede rápidamente, se previene el daño o su progresión, y la función física puede mejorarse al máximo sin más secuelas (20). Por lo tanto, el tratamiento de la artritis reumatoide requiere un enfoque estratégico mediante el cual la evaluación regular de la actividad de la enfermedad impulse adaptaciones terapéuticas o cambios de fármacos de acuerdo con dicha actividad (36).

No existe una terapia curativa para la AR, pero la intervención temprana con fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) mediante una estrategia de tratamiento dirigida puede prevenir la progresión de la enfermedad y la discapacidad relacionada con la AR (36). El metotrexato suele ser el fármaco de primera línea para la artritis reumatoide. Los agentes biológicos, como los

inhibidores del factor de necrosis tumoral, generalmente se consideran agentes de segunda línea o se pueden agregar para la terapia dual. Los objetivos del tratamiento incluyen la minimización del dolor y la inflamación de las articulaciones, la prevención del daño radiográfico y la deformidad visible, y la continuación de las actividades laborales y personales. El reemplazo articular está indicado para pacientes con daño articular grave cuyos síntomas están mal controlados por el tratamiento médico. Los pacientes que toman agentes biológicos deben someterse a pruebas de hepatitis B, hepatitis C, y tuberculosis (1).

3.5. Bioinformática

3.5.1. Definición

La bioinformática es una disciplina que tienen como objetivo el análisis e interpretación de datos biológicos, formulando criterios biológicos aplicados en un área experimental. Gracias a la creación del Proyecto Genoma Humano en los años 70, esta ciencia se ha abierto campo en el área de las biomédicas. Gracias a ello, buscamos la investigación interdisciplinaria entre las ciencias informáticas y las ciencias experimentales que estudian la vida como la biología y biomédica teniendo como base las matemáticas, física, química, estadística, entre otras. Esta disciplina se basa en la generación de evidencia científica de acuerdo con principios fisicoquímicos a por medio de bases de datos, aplicando métodos bioinformáticos para la solución de dilemas de las diferentes ciencias biológicas, y predicción de modelos estructurales de moléculas biológicas y procesos celulares para comprender su funcionamiento a través de representaciones de los sistemas biológicos, mediante el uso de herramientas computacionales (52).

3.5.2. Herramientas computacionales

Mediante el uso de software y hardware, la bioinformática procesa el gran tamaño de información biológica (conocido como minería de datos), velocidad de cálculo y el empleo eficiente de tiempo. Las herramientas computacionales son los programas informáticos y las diferentes bases de datos disponibles en línea utilizados en bioinformática, que son aplicados en el análisis de secuencias de ADN y proteínas, utilizados en centros de investigación, laboratorios biomédicos, industrias farmacéuticas y centros de bioinformática. Estos recursos

requieren de sistemas operativos y lenguajes especiales de programación para su aplicación, teniendo el sistema operativo Linux, y lenguajes de programación como Python, Java, C, C++, etc. La información biológica utilizada en la bioinformática se encuentra disponible en línea para toda la comunidad. Para la evaluación genómica y de nucleótidos, se emplea la International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC), donde se incluye las bases de datos del DNA Data Bank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL), National Center for Biotechnology Information (NCBI), etc (53).

Para las investigaciones en proteínas, se tienen las bases de datos de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB), UniProt, etc. En el caso de que el investigador no encuentra la información que necesita, y para ello emplea el método del secuenciamiento lineal masivo (52, 53, 54).

3.5.3. Diseño, obtención y modelamiento de proteínas

El conocimiento y predicción de la estructura de una proteína en su forma tridimensional, posibilita la comprensión del mecanismo de acción y participación molecular en los sistemas biológicos. Para la predicción de la estructura proteica (PSP) se emplean dos metodologías: modelado basado en plantillas (TBM) y predicción de estructura de novo, que se sustentan en bases de datos de secuencias y estructuras. Para la obtención de la estructura computacional con resolución se emplean métodos como cristalografía de rayos X, criomicroscopía electrónica, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), los cuales serán almacenados en bases de datos. La teoría del PSP es el descubrimiento del estado nativo de las proteínas en forma de estructuras tridimensionales, en condiciones fisiológicas “in vivo”. Para la búsqueda conformacional de estos modelos estructurales, se usan los métodos de Monte Carlo (MC) y la Dinámica Molecular (MD) (55,56).

3.5.4. Mecánica Molecular y Dinámica Molecular

Pertenece al modelado molecular matemático donde se plasma las moléculas en forma de esferas unidas por resortes, aplicados dentro de un sistema, con energía cambiante en contraste de la resistencia de las partículas, al inicio y al final de una simulación de desenvolvimiento de las moléculas dependiente del tiempo. La simulación de Dinámica Molecular (SDM) es una simulación computacional mediante el uso de la bioinformática que permite explorar el espacio conformacional de péptidos y proteínas y su interacción en medios nativos para predicciones físico-químicas de interacciones moleculares (57,58).

La SDM, mediante ecuaciones de velocidad y de acuerdo con la fuerza física ejercida en cada partícula, permite efectuar un evento biológico en pequeños tiempos de integración, bajo el concepto de una simulación. Este procedimiento comienza con una configuración molecular, continúa con la descripción de las interacciones atómicas y el modelamiento, posteriormente se ejecuta una simulación y muestra el análisis de la trayectoria. Tras realizar este procedimiento, hay diferentes cálculos de análisis de la calidad estructural de las trayectorias como (58).

3.5.4.1. Desviación de la raíz cuadrada media (RMSD)

Es una medida que resulta de la diferencia de valores estimados y valores observados, siendo dos coordenadas atómicas superpuestas (59,60).

3.5.4.2. Fluctuación cuadrática media (RMSF)

Es una medida del desplazamiento de un átomo, molécula, residuos, en relación con estructura de referencia (59,60).

3.5.4.3. Radio de giro (Rg)

Es la raíz cuadrada media de la distancia de los elementos de dispersión desde el centro de una masa en donde se muestra sin cambios en la inercia rotacional alrededor de un eje del centro de masa (59,60).

3.5.5. Análisis bioinformático

Para el análisis se utiliza la minería de datos que es empleada para el análisis de este volumen exponencial de información a través del empleo de software y servidores en línea orientados a las investigaciones biológicas. Este análisis permite replicar su metodología por su alta calidad y confiabilidad, siendo empleado en múltiples investigaciones en la actualidad. Dentro de los servidores utilizados en la presente investigación se encuentran PockDrug, PatchDock/FireDock, Ramachandran – RAMPAGE y ProSA (Protein Structure Analysis-Server) (62,63,64).

3.5.6. Bioinformática clínica

Esta nueva área se ha posicionado como el futuro de la investigación de las ciencias biomédicas, presentando una conexión con la medicina personalizada de precisión o medicina genómica. Esta área se encuentra orientada a la medicina clínica en busca de estrategias de diagnóstico a través del uso de biomarcadores genéticos y estrategias de tratamiento a través del desarrollo de nuevos fármacos. Dentro de esta rama encontramos el análisis de genomas, determinación estructural de proteínas a partir de la genómica, acoplamiento o docking molecular (interacciones ligando-receptor) (65,66,67,68).

3.5.7. Acoplamiento proteína-Ligando (Docking)

Este método de estudio da a conocer los diferentes acoplamientos de los diversos compuestos, ya sea proteína-ligando o proteína-proteína, dicho método de estudio es utilizado como reconocimiento de los potenciales sitios activos, así como para corroborar la existencia de algún acoplamiento frente a un entorno configurado virtualmente por el operador, ello con el fin de explorar las posibles uniones que puedan ocurrir entre la proteína-ligando (69,70).

3.5.8. Validación de estructuras

Para la validación de estructuras producto del acoplamiento (docking) es necesario corroborar mediante una aproximación probabilística el número de péptidos cuyas uniones son estadísticamente favorables, es decir son compatibles en un medio fisiológico, es importante catalogar el número y/o porcentaje de regiones favorecidas, permitidas y no permitidas. Dicho análisis

una vez culminada la dinámica molecular permite al operador corroborar si los nuevos péptidos obtenidos pueden llegar a ser replicables y asea en un medio in vitro, in vivo, etc (71,72,73).

3.6. Análisis de antecedentes investigativos

3.6.1. A nivel internacional

Autor: Melissa Mejia-Gutierrez, Bryan D. Vásquez-Paz, Leonardo Fierro, Julio R. Maza

Título: Reposicionamiento in Silico de moduladores de dopamina con posible aplicación a la esquizofrenia: mapeo de farmacoforos, acoplamiento molecular y análisis de la dinámica molecular

Resumen: Se realizaron cálculos teóricos con 70 medicamentos que han sido considerados en 231 ensayos clínicos como posibles candidatos para reutilizar los medicamentos para la esquizofrenia en función de sus interacciones con el sistema dopaminérgico. Se formuló una hipótesis de características farmacofóricas compartidas para apoyar nuestros cálculos. Para ello, hemos utilizado la estructura cristalina del receptor de dopamina similar a D2 en un complejo con risperidona, eticlorida y nemonaprida. Linagliptina, citalopram, flunarizina, sildenafil, minociclina y duloxetine fueron los medicamentos que mejor encajaban con nuestro modelo. Se estudiaron y compararon los cálculos de acoplamiento molecular, los resultados de la dinámica molecular, la penetración de la barrera hematoencefálica y la absorción intestinal humana con los resultados. De los seis fármacos seleccionados en la entrada de características de los farmacoforos compartidos, la flunarizina mostró la mejor puntuación de acoplamiento con los receptores de dopamina D2, D3 y D4 y tuvo una alta estabilidad durante las simulaciones de dinámica molecular. La flunarizina es un medicamento de uso frecuente para tratar las migrañas y el vértigo. Sin embargo, sus propiedades antipsicóticas se han planteado previamente, sobre todo debido a su posible capacidad para bloquear los receptores de dopamina D2 (81).

Autores: Matteo Pavan, Silvia Menin, Davide Bassani, Mattia Sturlese, Stefano Moro

Título: Estimación cualitativa de la estabilidad del complejo proteína-ligando a través de simulaciones de dinámica molecular de titulación térmica

Resumen: La predicción de la eficacia del ligando se ha relacionado durante mucho tiempo con las propiedades termodinámicas, como la constante de disociación de equilibrio, que considera tanto la asociación como las tasas de disociación de un complejo proteína-ligando definido. En los últimos 15 años, ha habido un cambio de paradigma, con un mayor interés en la determinación de las propiedades cinéticas, como el tiempo de residencia del fármaco objetivo, ya que se correlacionan mejor con la eficacia del ligando en comparación con otros parámetros. En este artículo, presentamos la dinámica molecular de titulación térmica (TTMD), un método computacional alternativo que combina una serie de simulaciones de dinámica molecular realizadas a temperaturas progresivamente crecientes con una función de puntuación basada en las huellas dactilares de interacción proteína-ligando para la estimación cualitativa de la estabilidad de unión proteína-ligando. El protocolo se ha aplicado a cuatro casos de prueba farmacéuticamente relevantes diferentes, incluyendo la proteína quinasa CK1 δ , la proteína quinasa CK2, la piruvato deshidrogenasa quinasa 2 y la proteasa principal del SARS-CoV-2, en una variedad de ligandos con diferentes tamaños, estructuras y valores de afinidad determinados experimentalmente. En los cuatro casos, TTMD fue capaz de distinguir con éxito entre compuestos de alta afinidad (baja gama nanomolar) y compuestos de baja afinidad (micromolares), demostrando ser una herramienta de detección útil para la priorización de compuestos en una campaña de descubrimiento de medicamentos (78).

Autores: Md Fulbabu Sk, Nisha Amarnath Jonniya, Rajarshi Roy, Parimal Kar

Título: Desentrañar el mecanismo molecular de reconocimiento de inhibidores seleccionados de la artritis reumatoide de próxima generación por Janus Kinase 1

Resumen: La artritis reumatoide (AR) es una afección crónica relacionada con el sistema inmunitario, principalmente de las articulaciones, y es altamente incapacitante y dolorosa. La inhibición de las vías de señalización de citoquinas relacionadas con la cinasa de Janus (JAK) utilizando moléculas pequeñas es frecuente hoy en día. La familia JAK pertenece a las proteínas citoplasmáticas no receptoras de tirosina (PTK), incluidas JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 (tirosina quinasa 2). JAK1 ha recibido una atención significativa después de ser

identificado como un objetivo prometedor para el desarrollo de terapias anti-RA. Actualmente, no hay estructura cristalina disponible para JAK1 en complejo con los medicamentos anti-RA de próxima generación. En el estudio actual, investigamos el mecanismo de unión de baricitinib, filgotinib, itacitinib y upadacitinib a JAK1 utilizando un método combinado de acoplamiento molecular, simulación de dinámica molecular y cálculo de energía libre de unión a través del esquema de área de superficie de mecánica molecular Poisson-Boltzmann (MM-PBSA). Encontramos que la afinidad de unión calculada disminuye en el orden upadacitinib > itacitinib > filgotinib > baricitinib. Debido al aumento de la contribución electrostática intermolecular favorable, el upadacitinib es más selectivo con JAK1 en comparación con los otros tres inhibidores. Los análisis de la correlación cruzada y de los componentes principales mostraron que las diferentes uniones de inhibidores afectan significativamente la dinámica del sitio de unión de JAK1. Además, nuestros estudios indicaron que los residuos hidrofóbicos y los enlaces de hidrógeno de la región de la bisagra (Glu957 y Leu959) de JAK1 desempeñaron un papel esencial en la estabilización de los inhibidores. El análisis de la red estructural de proteínas revela que el número total de enlaces y centros en JAK1/baricitinib (354, 48) es más significativo que los de apo (328, 40) y los otros tres complejos. El complejo JAK1/baricitinib muestra la mayor probabilidad de la comunidad mejor clasificada, lo que indica una red compacta del complejo JAK1/baricitinib, consistente con su mayor estabilidad que el resto de los cuatro sistemas. En general, nuestro estudio puede ser crucial para el diseño racional de inhibidores selectivos JAK1 con mejor afinidad (79).

Autores: Que-Huong Tran, Quoc-Thai Nguyen, Nguyen-Quynh-Huong Vo, Tan Thanh Mai, Thi-Thuy-Nga Tran, Thanh-Dao Tran, Minh-Tri Le, Dieu-Thuong Thi Trinh, Khac-Minh Thai.

Título: Modelado de farmacóforos 3D basado en la estructura para descubrir nuevos inhibidores de la interleucina 6: un cribado in silico, simulaciones de dinámica molecular y cálculos de energía libre vinculante

Resumen: La interleucina 6 (IL-6) es una citocina con varias funciones biológicas en la regulación inmunitaria, la hematopoyesis y la inflamación. Se han identificado niveles elevados de IL-6 en varios trastornos graves, como la sepsis, el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y, más recientemente, COVID-19. La actividad biológica de la IL-6 se basa en las interacciones con su receptor específico, IL-6R α , incluido el receptor IL-6 unido a la membrana (mIL-6R) y el receptor de IL-6 soluble (sIL-6R). Por lo tanto, la inhibición de la interacción entre estas dos proteínas sería un tratamiento potencial para las enfermedades relacionadas con la IL-6. Hasta la fecha, no se ha aprobado ningún medicamento de moléculas pequeñas disponible por vía oral. Este estudio se centra en encontrar moléculas pequeñas potenciales que puedan inhibir las interacciones proteína-proteína entre IL-6 y su receptor IL-6R α utilizando su estructura cristalina (PDB ID: 5FUC). En primer lugar, se construyeron dos modelos de farmacóforos basados en las interacciones entre los residuos clave de IL-6 (Phe74, Phe78, Leu178, Arg179, Arg182) e IL-6R α (Phe229, Tyr230, Glu277, Glu278, Phe279). Se examinó una base de datos de aproximadamente 22 millones de compuestos utilizando modelos de farmacóforos 3D, modelos de acoplamiento molecular y propiedades ADMET. Al analizar la capacidad interactiva de los compuestos acoplados conéxito con aminoácidos importantes, se seleccionaron 12 ligandos potenciales para su posterior análisis a través de simulaciones de dinámica molecular. Sobre la base de la estabilidad de los complejos, la alta tasa de interacciones de cada ligando con los residuos clave de IL-6/IL-6R α y el cálculo de energía libre de baja unión, se identificaron dos compuestos ZINC83804241 y ZINC02997430 como los candidatos más potenciales para inhibidores de la IL-6. Estos resultados allanarán el camino para el diseño y la optimización de compuestos más específicos para combatir la tormenta de citoquinas en pacientes graves con coronavirus (80).

Autores: Ardita Aliko, Marta Kaminska, katherine falkowski, Ewa Bielecka, Malgorzata Benedyk-Machaczka, Stanisław Malicki, Joanna Koziół, alicia wong, Danuta Bryzek, Tomasz Kantyka, Piotr Mydel

Título: Descubrimiento de un nuevo inhibidor reversible potencial de la peptidil arginina deiminasa

Resumen: La citrulinación, una modificación postraduccional, es catalizada por peptidilarginina deimasas (PAD), una familia única de enzimas que convierte la peptidil-arginina en peptidil-citrulina. Se observa sobreexpresión y/o aumento de la actividad de PAD en la artritis reumatoide (AR), la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y el cáncer. Además, las PAD bacterianas, como *Porphyromonas gingivalis* PAD (PPAD), pueden tener un papel en la patogenia de la AR, lo que indica que las PAD son dianas terapéuticas prometedoras. En este documento, se examinaron seis compuestos nuevos como inhibidores potenciales de PAD4 y PPAD humanos, y se compararon con un inhibidor de PAD irreversible, Cl-amidina. Cuatro de los compuestos probados (compuestos 2, 3, 4 y 6) exhibió una potencia de inhibición de rango micromolar contra PAD4 y ningún efecto contra PPAD en los ensayos invitro. El compuesto 4 fue capaz de inhibir la citrulinación de la histona H3 inducida por PAD4 con mayor eficacia que la Cl-amidina. En conclusión, el compuesto 4 fue muy eficaz y presenta una dirección prometedora en la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento de la AR (75).

Autor: Yuan luo, Kyohei Arita, Mónica Bhatia, Bryan Knuckley, Young Ho Lee , Michael R. Stallcup , mamoru sato , Pablo R Thompson

Título: Inhibidores e inactivadores de la proteína arginina deiminasa 4: caracterización funcional y estructural.

Resumen: La proteína arginina desiminasa 4 (PAD4) es un corregulador transcripcional que cataliza la conversión dependiente de calcio de residuos específicos de arginina en proteínas a citrulina. Recientemente, informamos la síntesis y caracterización de F-amidina, un inactivador irreversible potente y biodisponible de PAD4. En este documento, informamos nuestros esfuerzos para identificar los requisitos estéricos y de grupos salientes para la inactivación de PAD4 inducida por F-amidina, la estructura del complejo PAD4-F-

amidina-calcio y estudios in vivo con N- α -benzoil-N⁵-(2-cloro-1-iminoetilo)-L-ornitina amida (Cl-amidina), un inactivador de PAD4 con potencia mejorada. Los inactivadores de PAD4 descritos en el presente documento serán sondas farmacológicas útiles para caracterizar las funciones fisiológicas definidas de forma incompleta de esta enzima. Además, representan compuestos líderes potenciales para el tratamiento de la artritis reumatoide porque un creciente cuerpo de evidencia respalda el papel de PAD4 en el inicio y la progresión de este trastorno autoinmune crónico (76).

Autor: Van C willis , Alison M. Gizinski , Nirmal K Banda , Corey P. Causey , Bryan Knuckley , Kristen N Córdova , Yuan Luo , Brandt Levitt , Magdalena Glogowska , Piyanka Chandra , Liudmila Kulik , William H. Robinson , William P. Arend , Paul R. Thompson , V Michael Holers.

Título: La N- α -benzoil-N⁵-(2-cloro-1-iminoetil)-L-ornitina amida, un inhibidor de la proteína arginina deiminasa, reduce la gravedad de la artritis inducida por colágeno murino

Resumen: La artritis reumatoide se asocia con el desarrollo de autoanticuerpos contra autoproteínas citrulinadas. Se sabe que las proteínas sinoviales citrulinadas, que se generan a través de las acciones de las proteínas arginina deiminasas (PAD), se desarrollan en el modelo murino de artritis inducida por colágeno (CIA) de artritis inflamatoria. Dados estos hallazgos, evaluamos si la N- α -benzoil-N⁵-(2-cloro-1-iminoetil)-L-ornitina amida (Cl-amidina), un inhibidor pan-PAD recientemente descrito, podría afectar el desarrollo de artritis y autoinmunidad mediante el tratamiento de ratones en el modelo CIA con Cl-amidina en los días 0-35. El tratamiento con Cl-amidina redujo la citrulinación sérica y sinovial total, disminuyó la actividad clínica de la enfermedad en ~50 % y redujo significativamente los anticuerpos IgG2a anti-colágeno tipo II de ratón. Además, Las puntuaciones histopatológicas y la deposición total de C3 del complemento fueron significativamente más bajas en los ratones tratados con Cl-amidina en comparación con los controles del vehículo. Los análisis de micromatrices sinoviales demostraron una menor reactividad de IgG frente a varios epítomos nativos y citrulinados en comparación con los controles del vehículo. El tratamiento con Cl-amidina no mejoró la artritis inducida por colágeno Ab, lo que sugiere que su principal mecanismo de protección no estuvo

mediado por vías efectoras. Los niveles reducidos de proteínas sinoviales citrulinadas observados en ratones tratados con CI-amidina son consistentes con la noción de que la CI-amidina deriva su eficacia de su capacidad para inhibir la actividad de eliminación de las PAD. En total, estos resultados sugirieron que los PAD son participantes necesarios en los procesos inflamatorios autoinmunes y posteriores en la CIA (77).



4. Hipótesis

Alternativa Ha: La alteración de la conformación estructural de la PAD4 por la utilización de los compuestos diseñados en modelos computacionales inhibiría la formación de anti CCP para el desarrollo de la AR.

Nula Ho: La alteración de la conformación estructural de la PAD4 por la utilización de los compuestos diseñados en modelos computacionales no inhibiría la formación de anti CCP para el desarrollo de la AR.





CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación

1.1. Técnicas

1.1.1. Obtención y Preparación de las Estructuras

En el presente estudio, será la búsqueda de las estructuras en la base de datos del Protein Data Bank, seleccionando la estructura de la Peptidil Arginin Deiminasa tipo 4 que posee a los criterios de calidad requeridos además se ensamblarán las estructuras químicas, mediante inteligencia artificial Gaussian View con las cuales van a interactuar dicha proteína, todas estas estructuras van a ser visualizadas y analizadas a través del programa UCSF Chimera, para su preparación previa antes de la Dinámica Molecular (56,57).

1.1.2. Simulación de Dinámica Molecular

El presente estudio, se realizará a las simulaciones por medio de la dinámica molecular de 100 NS en el programa GROMACS interactuando la peptidil arginindeiminasa tipo IV con sus potenciales inhibidores, utilizando el campo de fuerza OPLSAA para las proteínas y modelo de agua SPC216. La simulaciones dedinámica molecular se realizarán bajo el colectivo canónico NVT (número de moléculas, volumen y temperatura constante) (56).

La temperatura será a una constante de $T=309.65K$ mediante el acoplamiento de untermostato llamado Nose-Hover en un tiempo de 0.01 pico segundos. Se utilizará un paso de integración de 2ps. se ubicará la proteína dentro de una caja cúbica con 1.5 A del centro de la proteína a alrededores se adicionarán las moléculas de agua ayudando a contener -40,000 átomos. Asimismo, añadiremos los iones para neutralizar cada sistema se realizará una minimización de la energía usando el algoritmo de descenso más bajo, seguida por una simulación de dinámica molecular de 10 ns con restricciones armónicas de las proteínas para equilibrar agua los iones (58).

1.1.3. Análisis de la Dinámica Molecular

Posteriormente realizaremos el análisis mediante un método convergente llamado RMSD (root-mean-square derivation), evaluaremos la fluctuación mediante RMSF (root-mean-square-fluctuation) y el radio de giro, dichas trayectorias serán analizadas en el UCSF Chimera (59,60).

1.1.4. Predicción de la Drogabilidad

Para la identificación de los bolsillos o Pockets utilizaremos un servidor llamado PockDrug el cual mide la drogabilidad (valor de modulación de un blanco mediante la interacción con un posible agente terapéutico), todos los archivos PDB de la Peptidil Arginin Desaminasa tipo IV los cuales van a interactuar con los potenciales inhibidores, se van a cargar a este servidor y se dice seleccionar el método de “predicción de drogabilidad de las proteínas” para poder estimar el bolsillo terapéutico (69).

1.1.5. Acoplamiento Molecular

Los archivos de salida de dicho proceso de simulación de cada proteína con su potencial inhibidor sintético serán convertidos de archivo .gro a .pdb estos van a ser acoplados en el servidor FireDock (Fast Interaction Refinement in Molecular Docking) en el cual se realizarán todos los acoplamientos necesarios y finalmente consideraremos el primer modelo estructural del refinamiento como el mejor candidato, así como datos sobre lo que es la energía global, las interacciones de Van-der-Waals activo/repulsivo que puedan haber ya sean de tipo atractivo o repulsivo, la energía de contacto atómico y los enlaces de hidrógeno (71).

1.1.6. Validación de Estructuras

La validación de las estructuras obtenidas luego de los diferentes procesos por los servidores computacionales se hará por medio del diagrama de Ramachandran el cual hallará la cantidad de residuos de la región favorecida, la región permitida y la región atípica además usaremos el programa ProSA con el fin de obtener la calidad general del modelo (a través de ese The Score), en la calidad del modelo local y la posición de la secuencia (72).

1.2. Instrumentos

1.2.1. Software

1.2.1.1. GROMACS v.5.0.5

Paquete de software de código abierto, que permite realizarsimulaciones de dinámica molecular, se basan en ecuaciones de movimiento de tipo Newton y ano para sistemas de partículas (moléculas bioquímicas: proteínas lípidos ácidos nucleico) y sus interacciones enlazadas y no en los enlazadas (simulaciones del sistema biológico) (61).

1.2.1.2. UCSF CHIMERA-1.11.2

Software que permite una visualización interactiva de todas las estructuras bio moleculares y datos afines, usando para su análisis y función tanto sea para la estructura como para la densidad como para el ensamblaje, trayectoria alineación y acoplamiento de secuencias generando archivos de imagen y video de muy alta calidad (63).

1.2.2. Servidores

1.2.2.1. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB-PDB).

Recurso de datos digitales disponibles públicamente en Interneten donde encuentras la estructura función y evolución tridimensional de macromoléculas biológicas (proteínas, ensamblajes, ácidos nucleicos). Se utilizan en la investigación y educación de biología básica, biotecnología y energía, así como la biomedicina este servidor forma parte del Banco Mundial de datos de proteínas lo cual nos permite una mejor gestión de datos en base a los principios FAIR (Encontrable-Accesible-Interoperable-Reusable-Computable) (69).

1.2.2.2. Pocket Druggability Prediction (PockDrug).

Recurso digital en línea que nos permite obtener una predicción computacional de la capacidad de formación de los bolsillos de proteínas para unirse a moléculas mediante la conformación de propiedades (geometría, aromaticidad, hidrofobicidad) siendo parte de la fase de identificación del potencial farmacológico de una macromolécula; además este servidor

proporciona herramientas para la caracterización y análisis de los bolsillos de la proteína a investigar (69).

1.2.2.3. FireDock.

Recurso digital en línea que nos permite obtener una predicción computacional de la capacidad de formación de los bolsillos de proteínas para unirse a moléculas mediante la conformación de propiedades (geometría, aromaticidad, hidrofobicidad) siendo parte de la fase de identificación del potencial farmacológico de una macromolécula; además este servidor proporciona herramientas para la caracterización y análisis de los bolsillos de la proteína a investigar (70).

1.2.2.4. Ramachandran Plot Assessment RAMPAGE.

Recurso nos permite generar un diagrama de Ramachandran el cual va a contener las regiones favorecidas permitidas y atípicas que se interpretan para la validación geométrica y la calidad estereoquímica de la estructura analizada (73).

1.2.2.5. Protein Structure Analysis-Server ProSA.

Servidor nos permitirá determinar el pliegue nativo de la proteína, esta determinación sirve para modelos experimentales como teóricos, mediante el reconocimiento de errores. Además, el servidor también sea utilizado para el refinamiento, predicción y modelado de estructuras proteicas brindando un puntaje de calidad y visualización tridimensional de los elementos erróneos de la proteína analizada (72,73).

1.3. Materiales de verificación

- Workstation con memoria RAM de 64 GB, 3 discos duros de 01, 04 y 06 TB y procesador E7 3.0GHz; 2 Tarjetas Gráficas NVIDIA GeForce GTX 1080.
- Software de bioinformática: Gromacs v.5.0.5, UCSF Chimera.
- Servidores de bioinformática: RCSB Protein Data Bank (PDB), PockDrug (Pocket Druggability Prediction), PatchDock/FireDock, Ramachandran Plot Assessment - RAMPAGE, ProSA (Protein Structure Analysis-Server) (82).

2. Campo de Verificación

2.1. Ámbito

El presente trabajo se realizará de forma virtual con el apoyo del WorkStation del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular-CIIM de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú (82).

2.2. Temporalidad

El presente trabajo se llevará a cabo en el periodo comprendido entre julio del 2022 y febrero 2023.

2.3. Unidades de estudio

El estudio utilizará estructuras moleculares que serán obtenidos de Gaussian View y Protein Data Bank.

2.3.1. Criterios de selección

2.3.1.1. Criterios de Inclusión

- Estructuras completas.
- El menor tamaño en Angstroms de difracción de Rayos X, Solución de Resonancia Magnética Nuclear o Microscopía Electrónica (82).

2.3.1.2. Criterios de Exclusión

- Estructuras incompletas.
- El mayor tamaño en Angstroms de difracción de Rayos X, Solución de Resonancia Magnética Nuclear o Microscopía Electrónica (82).

3. Estrategias de Recolección de Datos

3.1. Organización

- Mediante la base de datos Protein Data Bank, usaremos los modelos estructurales de la proteína de la arginina Desaminasa tipo IV y las estructuras químicas de sus inhibidores.
- Se realizarán las preparaciones de las estructuras para el acoplamiento específico de los diferentes compuestos mediante el software UCSF Chimera.
- Se emplearán técnicas de dinámica molecular utilizando el software Gromacs v.5.0.5 para las simulaciones.

- Para el análisis de las nuevas estructuras, se utilizarán los servidores PockDrug y PatchDock/FireDock para identificar los bolsillos y realizar el acoplamiento molecular respectivamente.
- Para la validación de las estructuras estudiadas, se utilizará el servidor del diagrama de Ramachandran (RAMPAGE Plot Assesment de la Universidad de Duke) y el servidor ProSA (Protein Structure Analysis Server) (82).

3.2. Recursos

3.2.1. Humanos

- Investigador
- Asesores

3.2.2. Institucionales

- Facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica de Santa María.
- Centro de Investigación en Ingeniería Molecular – CIIM (82).

3.2.3. Materiales

- Workstation con 64 GB de memoria RAM y 3 discos duros de 1, 4 y 6 TB; 2 Tarjetas Gráficas NVIDIA GeForce GTX 1080
- Software de bioinformática: Gromacs v.5.0.5, UCSF Chimera
- Servidores de bioinformática: RCSB Protein Data Bank (PDB), PockDrug (Pocket Druggability Prediction), PatchDock/FireDock, Ramachandran Plot Assesment - RAMPAGE, ProSA (Protein Structure Analysis-Server) (82).

3.2.4. Financieros

Autofinanciado.

3.3. Validación de instrumento

La presente investigación no requiere validación del instrumento.

3.4. Criterios Éticos

El presente trabajo no presenta dilemas éticos no utilizará información personal ni específica ni muestras biológicas vivas, no intervendrá en ningún ser biológico, no generará algún potencial de riesgo ni vulnerabilidad de los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos es por ello que no requiere tener la aprobación de un comité de ética (82).



CAPÍTULO III
RESULTADOS

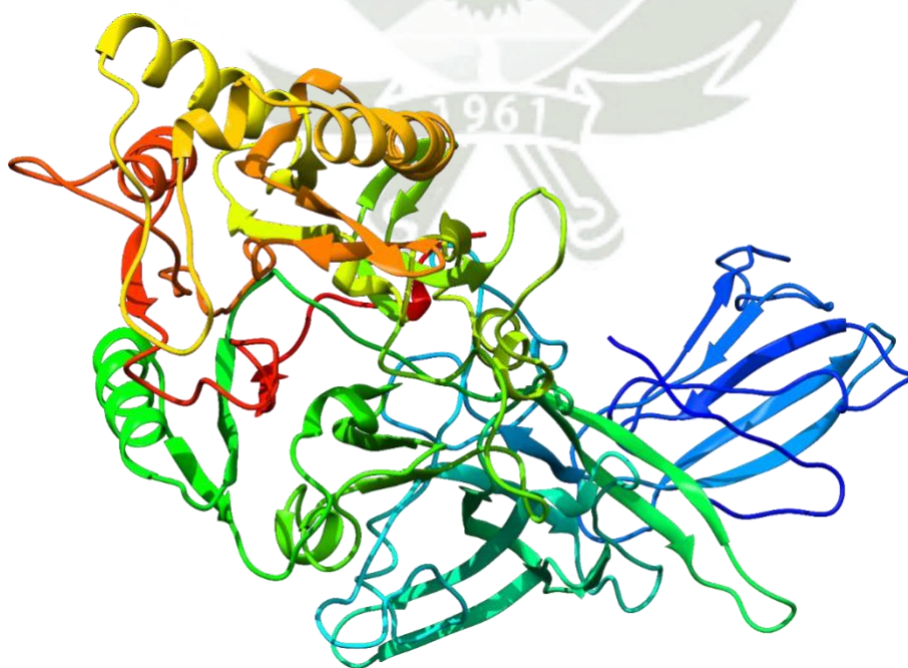
1. Estructuras Moleculares

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

La proteína Peptidil-Arginina-Deminasa 4 (PAD4) fue ubicada en la base de datos Protein Data Bank (PDB) con el código 3APM, el archivo fue limpiado, la estructura no se hallaba completa, debido a la pérdida de algunos aminoácidos, los cuales fueron completados median el uso de Modeller, obteniendo una estructura completa, esta fue sometida a una minimización de las fuerzas, utilizando el paquete Gromacs, y una versión de doble precisión, para lograr un mínimo real de las fuerzas, luego de ello procedimos a introducir el efecto de la temperatura mediante un ensamble canónico (NVT), por el espacio de una trayectoria de 10ns, con pasos de 1fs y una temperatura de referencia de 309.65K, esta estructura final fue sometida a la búsqueda del equilibrio, en un ensamble Isobárico – Isotérmico (NPT) a una presión de referencia de 1bar y una temperatura de referencia de 309.65K y una trayectoria de 100ns. La estructura estabilizada se presenta en la figura 4.

Figura 4

Estructura Terciaria de la PAD4 al finalizar la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT.



Fuente: Elaboración propia.

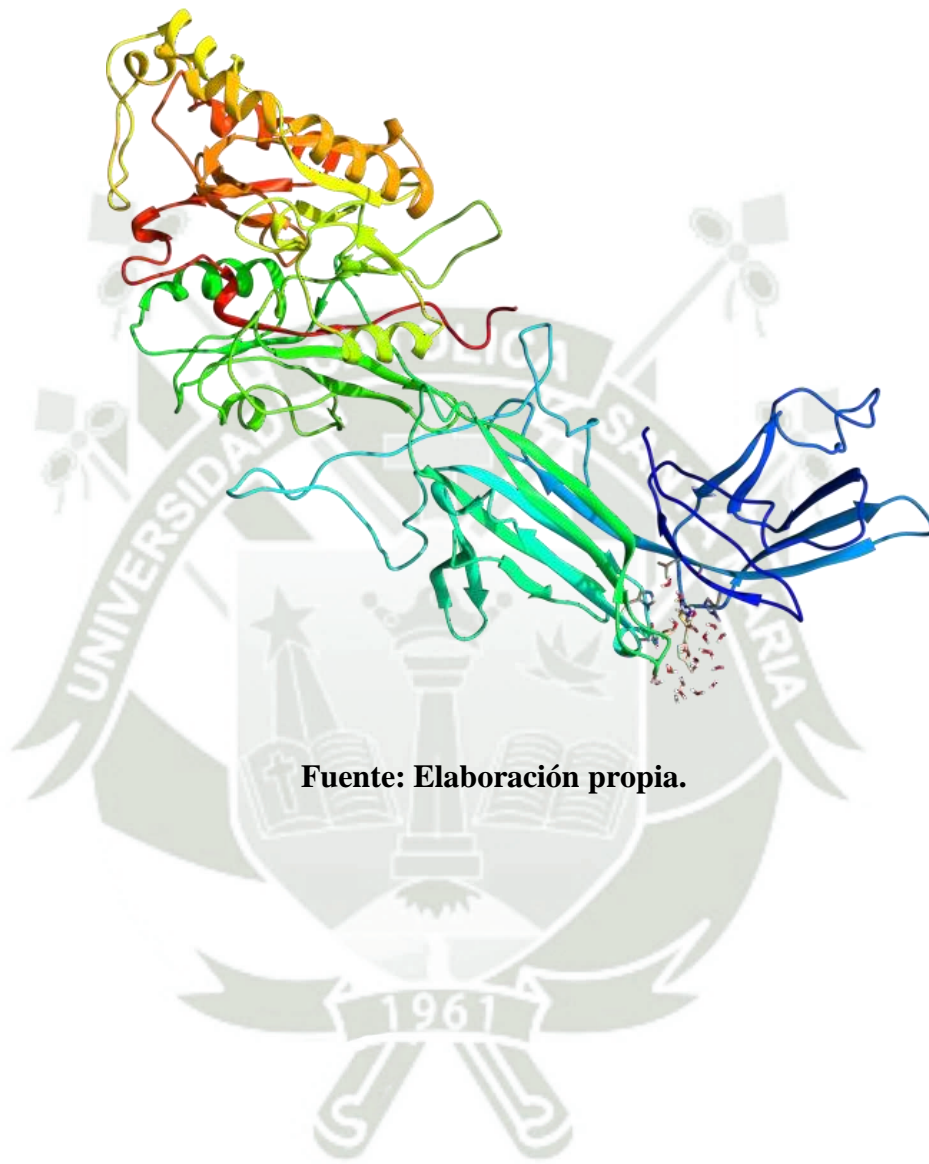
EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

En los diferentes modelados de dinámica molecular de la PAD4 podemos observar los resultados finales con el acoplamiento el cual, se logró mediante el uso de la herramienta FireDock, al momento de analizar las diferentes muestras obtenidas se hizo una discriminación de las diferentes posibles uniones, eligiendo las más estables energéticamente (aquellas que tenían un coeficiente de liberación de energía negativo) por lo cual obtuvimos el sitio activo con mayor probabilidad donde se vaya a unir el potencial inhibidor con la proteína, dicha muestra es muy importante para continuar los siguientes análisis de datos, tales como el RMSD, RMSF, Radio de Giro y Diagrama de Ramachandran.

Al alinear las estructuras tridimensionales se observan grandes diferencias, en la figura 5 podemos apreciar la proteína obtenida PAD4 culminada la simulación molecular con el ligando (Compuesto 2), se observa mayores láminas betas y loops conectando las alfa hélices y láminas betas. Asimismo, se puede apreciar una inclinación en las láminas betas circundantes al ligando.

Figura 5

Estructura Cuaternaria de la PAD4 y el Compuesto 2 al finalizar la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT.

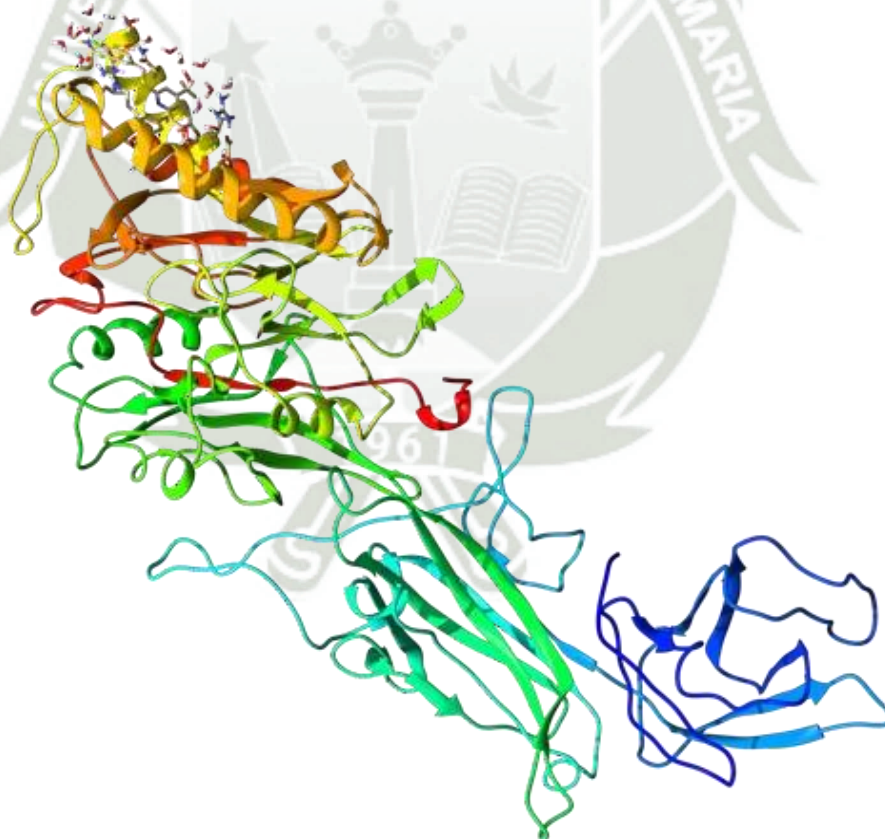


EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

En la figura 6 podemos observar a la proteína luego de su minimización y optimización interactuando con el compuesto 4. Se presenta la secuencia cuaternaria de aminoácidos de la proteína e, interactuando con ella al ligando. Se observan las alfa hélices esquematizadas con resortes, las flechas esquematizando las láminas beta y los loops que las conectan, podemos apreciar la formación de una lámina beta en un conformero determinado de la proteína. Dicha lámina beta no se observa en la estructura terciaria.

Figura 6

Estructura Cuaternaria de la PAD4 y el Compuesto 4 al finalizar la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT.



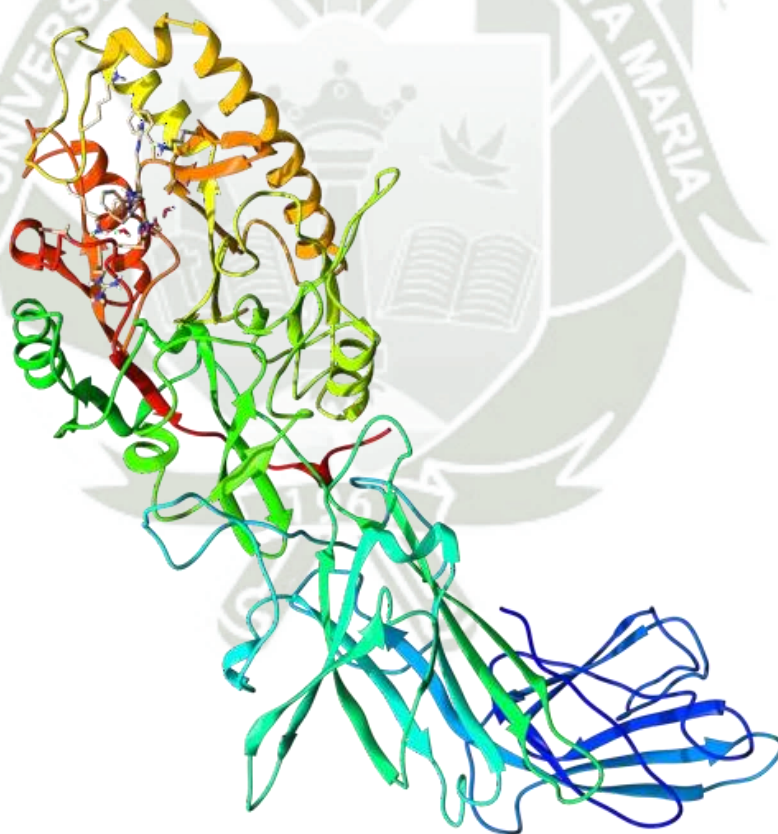
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Éstas estructuras tridimensionales fueron elaboradas con UCSF Chimera- un sistema de visualización para investigación y análisis exploratorios. En la Figura 7 podemos observar el acoplamiento molecular de la PAD4 y la Cl-Amidina. Se observa que las alfa hélices de los aminoácidos dejan de estar superpuestas por lo que ya no compartirían una distribución espacial similar, asimismo las láminas beta y los loops presentan un nuevo posicionamiento tras la dinámica molecular.

Figura 7

Estructura Cuaternaria de la PAD4 y la Cl-Amidina al finalizar la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT.



Fuente: Elaboración propia.

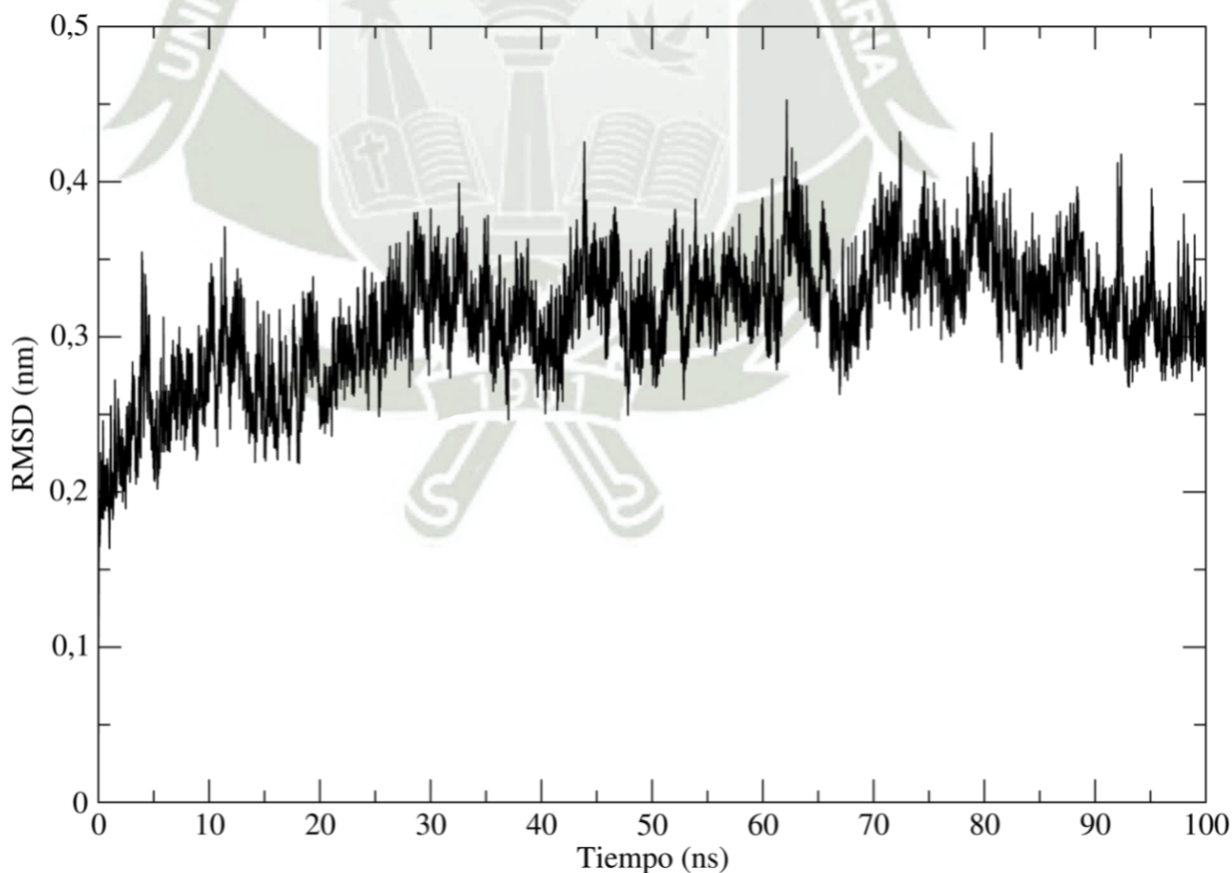
2. Análisis de la Dinámica Molecular

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener la desviación cuadrática media de las distancias (RMSD) para la simulación de dinámica molecular en el ensamble NPT, para nuestra proteína, pudimos observar que se ha llegado a la zona de equilibrio, debido a que a partir de los 35ns la estructura presenta una fluctuación menor a 0.2nm, lo que nos indica que la proteína ha llegado a su zona estable bajo las condiciones del ensamble. En los últimos 20ns, la estructura parece que presenta un proceso de compresión debido a que podemos observar una disminución en el RMSD.(ver figura 8)

Figura 8

**RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la
Proteína PAD4**

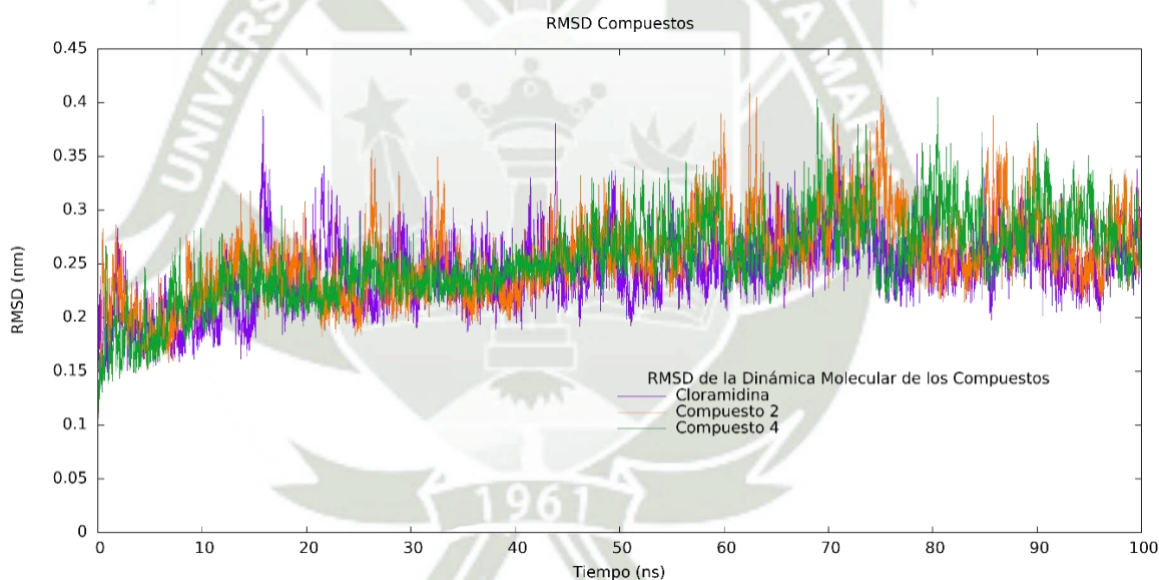


EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

La estabilidad de las simulaciones de Dinámica Molecular de los compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina) fue evaluada mediante el RMSD en 100 ns. Como se puede observar en la Figura 9 todos los sistemas se mantuvieron estables luego de los 30 ns aproximadamente y el valor de RMSD no superó los 0.5 nm. Podemos observar también, la presencia de fluctuaciones a partir de los 15 ns en la Cloramidina sin embargo vemos que llega a una estabilidad a partir de los 20 ns.

Figura 9

RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de los compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina)



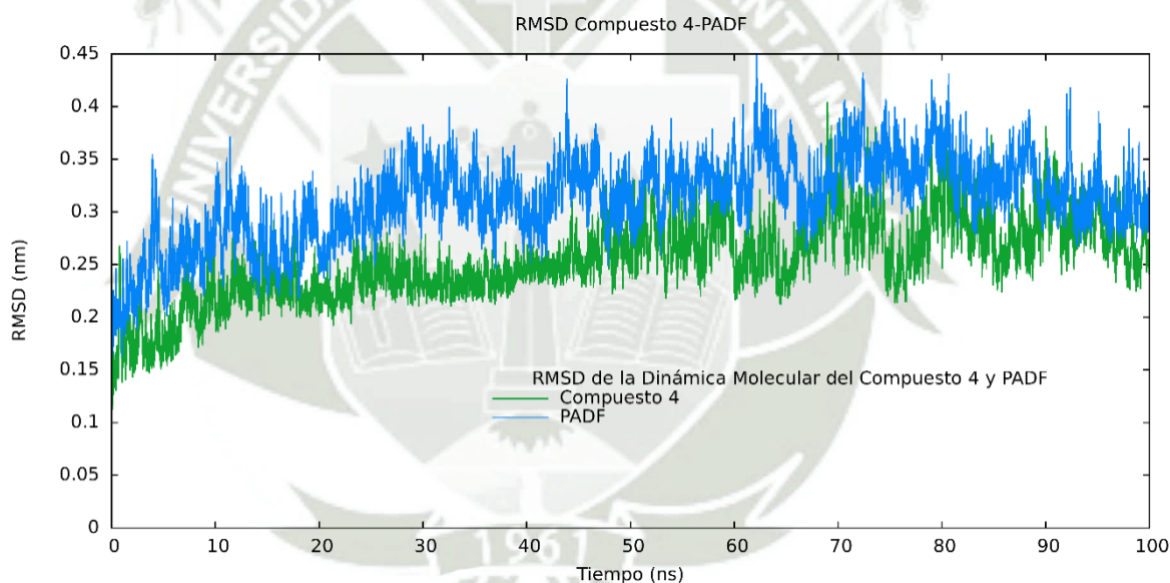
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Para el caso de los compuestos y la PAD4 se presentan los cálculos de RMSD haciendo superposición previa, de manera de intentar visualizar modificaciones de la estructura. En la Figura 10 se observa que ambos complejos alcanzan la estabilidad a partir de los primeros 8 ns. Se visualiza una variación de energía entre los 30 y 40 ns en el compuesto 4 que podría indicar un proceso de compresión.

Figura 10

**RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la
Proteína PAD4 y el compuesto 4**



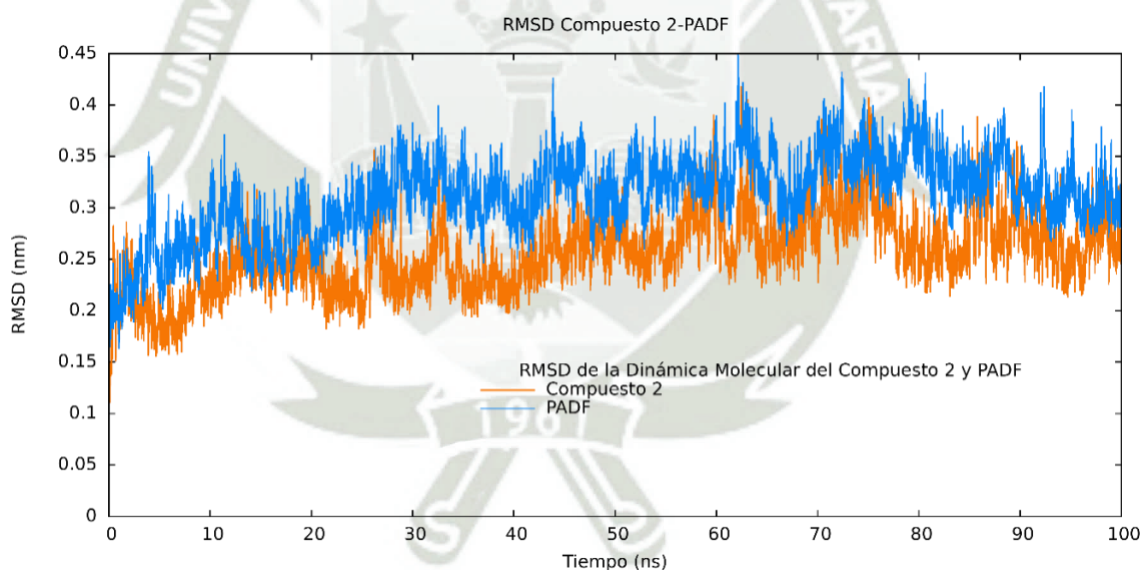
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al analizar el valor RMSD a partir de las simulaciones de la PAD4 y el Compuesto 2, se observa en la Figura 11 un aumento durante el primer nanosegundo de simulación, seguido por una disminución de la pendiente en los 6 ns siguientes. Sin embargo, a partir de los 10 ns el Compuesto 2 mantiene los nm entre 0.2 y 0.35, lo que indica su equilibrio. Además se observa una estabilidad de dicho compuesto en los 45 ns alcanzando una variación de 0.15 nm la cual se ve sostenida en la simulación de 100 ns indicándonos no solo capacidad de unirse a la proteína sino la capacidad de mantener esta unión a lo largo de la dinámica.

Figura 11

**RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la
Proteína PAD4 y el Compuesto 2**



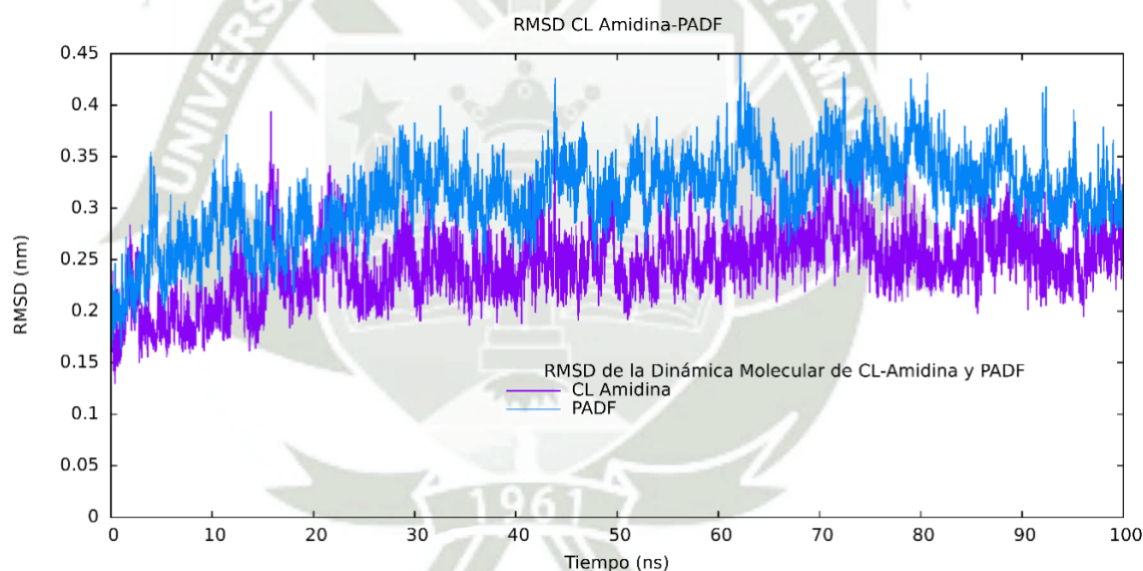
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

En la Figura 12, se presenta el análisis RMSD para la estabilidad molecular de la Cloramidina y la PAD4 estudiados tras la simulación de Dinámica Molecular, se observa que la Cloramidina exhibe un equilibrio después del primer nanosegundo, sin embargo presenta una disminución abrupta a partir del tercer nanosegundo con una duración no mayor de 2 ns. Se visualiza su acoplamiento a lo largo de los 100 ns, indicándonos su equilibrio a lo largo de la Dinámica Molecular.

Figura 12

**RMSD de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la
Proteína PAD4 y la Cloramidina**



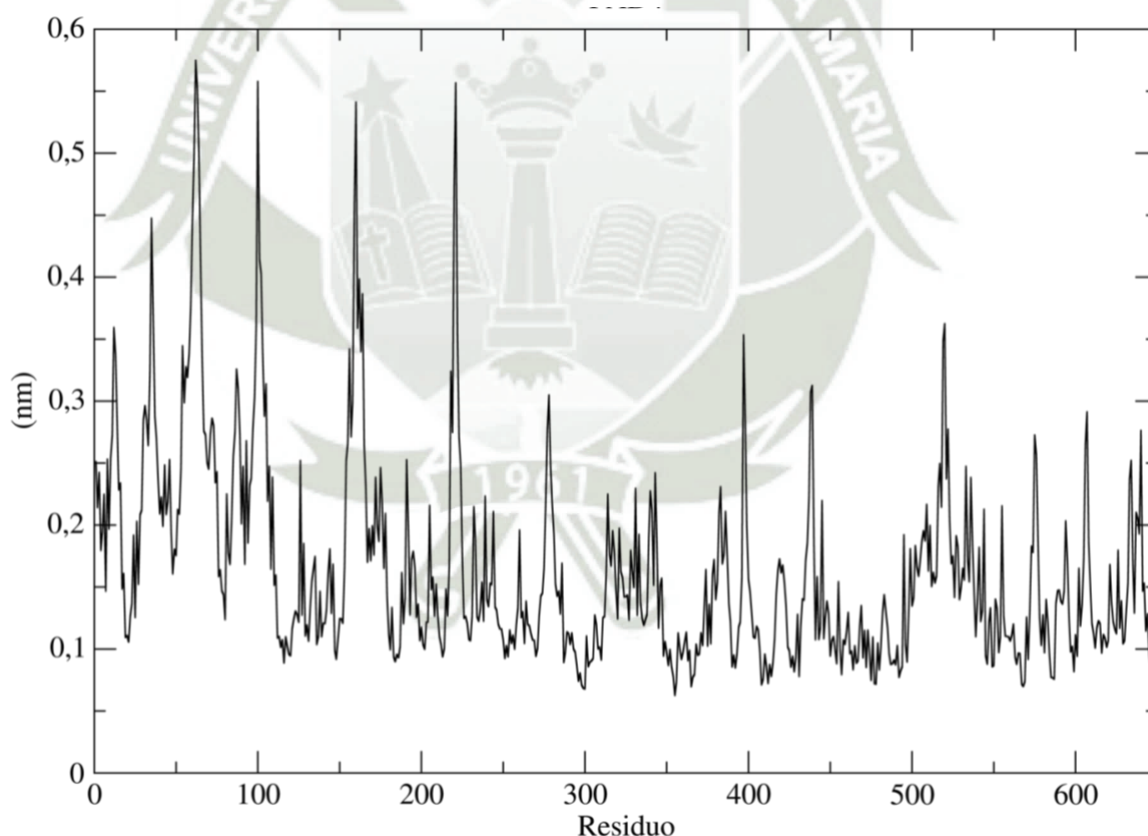
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener la fluctuación de los diferentes residuos durante la trayectoria de la simulación molecular en el ensamble NPT, de esta podemos observar claramente que en la región de los primeros 240 aminoácidos o residuos, se encuentra la mayor fluctuación, esto probablemente debido a una interacción con el solvente o por la presencia de las hojas beta, esto no es concluyente, pero se observa en forma natural cuando encontramos en las regiones iniciales estructuras secundarias de tipo hoja beta, esto lo podemos observar en la figura 13

Figura 13

**RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la
Proteína PAD4**



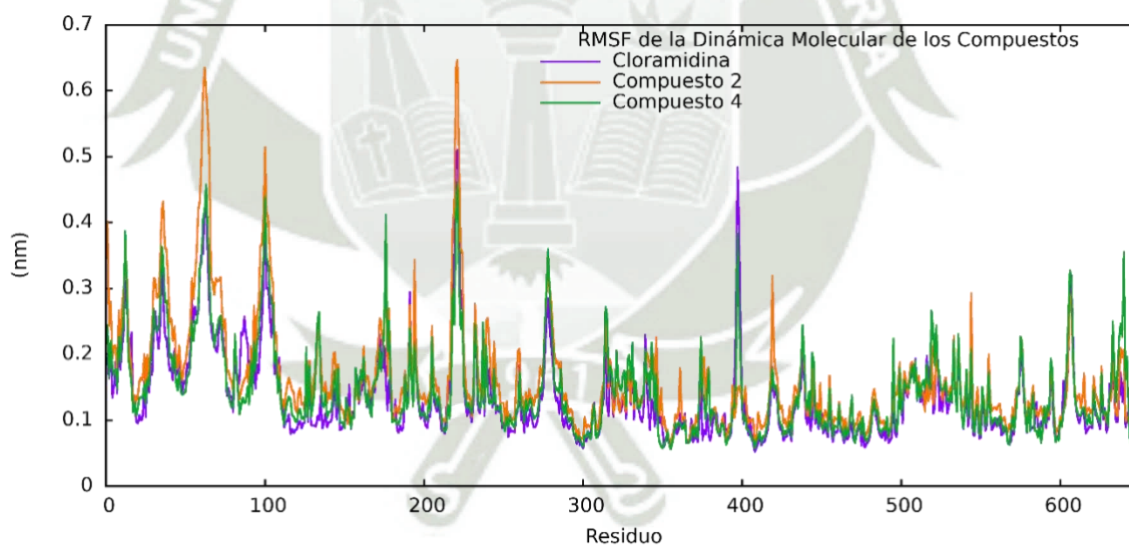
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener la fluctuación cuadrática media de los residuos en las simulaciones de la proteína y sus ligandos, podemos observar que hay mayor fluctuación del Compuesto 2 entre los aminoácidos 30 al 100, del 200 al 250, se puede visualizar que el movimiento de los aminoácidos es de 0.6 nm en su pico máximo. Observamos también que la Cl-Amidina presenta mayor fluctuación entre los aminoácidos 390 a 410, sin embargo, el movimiento de aminoácidos no alcanza al Compuesto 2, debido a que llega a 0.5 nm. Finalmente podemos observar el Compuesto 4 que no revela una diferencia significativa en cuanto a movimientos estructurales, esto lo podemos observar en la figura 14.

Figura 14

RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de los compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina)



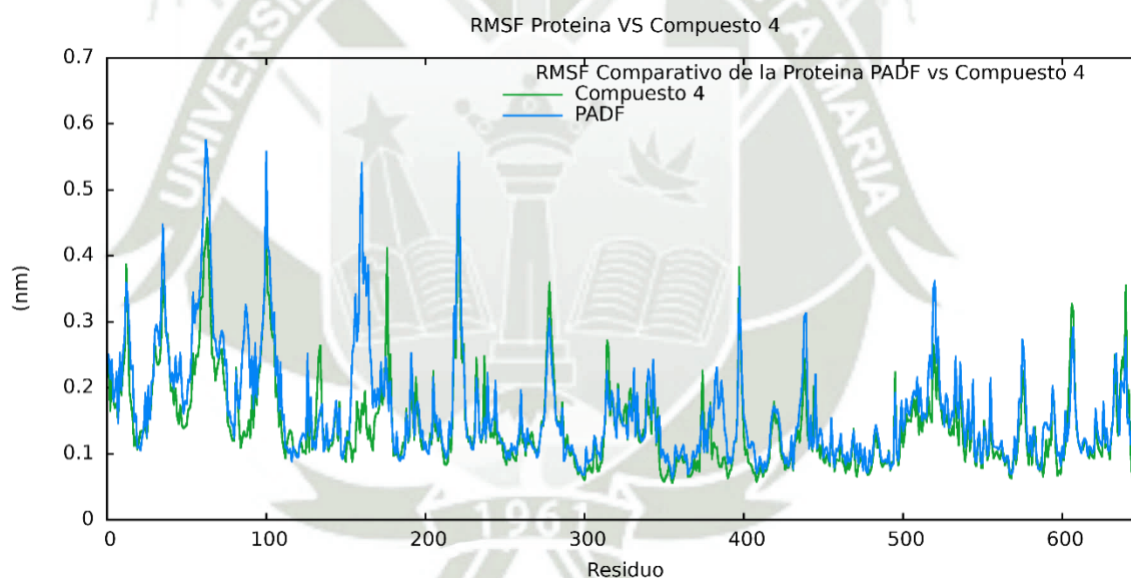
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al comparar el RMSF de la PAD4 y el Compuesto 4 observamos menor fluctuación de los aminoácidos del Compuesto. Observamos un pico entre los 150 a 180 aminoácidos que llega a los 0.4 nm, sin embargo, no existe diferencia significativa. Es por ello que al utilizar el RMSF se encuentra muy útil para comparar las magnitudes de las fluctuaciones de cada partícula del sistema en un rango de tiempo de simulación.

Figura 15

RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y el Compuesto 4



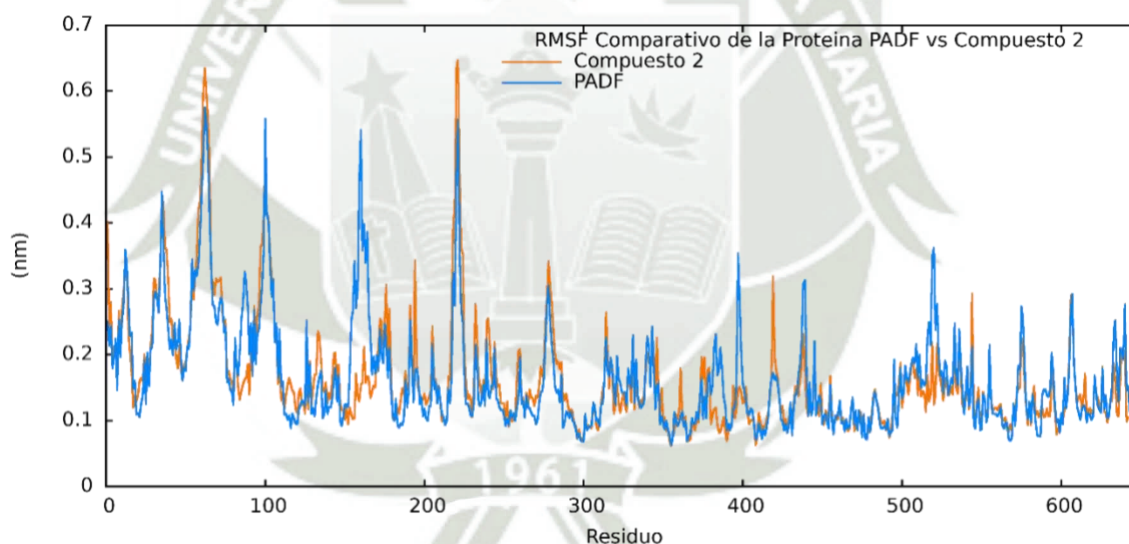
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

En la Figura 16 podemos observar la variación de las fluctuaciones de RMSF de la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 en relación de las fluctuaciones registradas del Compuesto 2. Podemos observar picos de movimientos entre los aminoácidos 30 al 100, del 200 al 250, que superan a las fluctuaciones de la PAD4. Se puede visualizar además, que el movimiento de los aminoácidos es de 0.6 nm en sus picos máximos. Lo que nos indica que hay una mayor flexibilidad de la PAD4 unida al Compuesto 2.

Figura 16

RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y el Compuesto 2



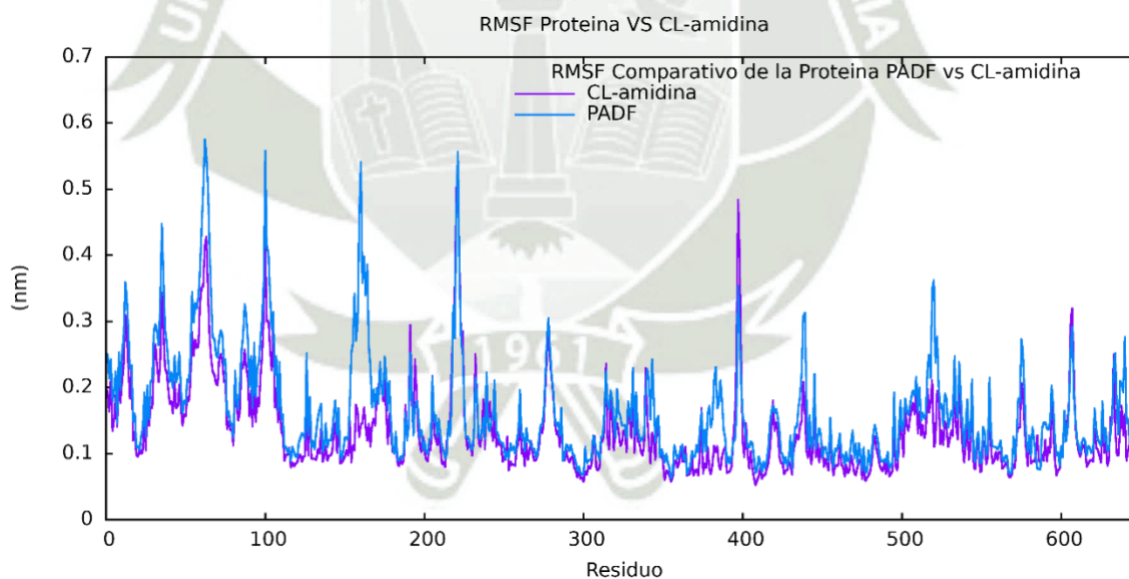
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

En la Figura 17 podemos observar la variación de las fluctuaciones de RMSF de la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 en relación de las fluctuaciones registradas de la Cl-Amidina. Podemos observar un solo pico de movimientos de la estructura entre los aminoácidos 390 al 405, que supera a las fluctuaciones de la PAD4. Se puede visualizar, además, que el movimiento de los aminoácidos es de 0.5 nm en éste pico máximo. Se expresa también que en la región de los primeros 240 aminoácidos o residuos, se encuentra la mayor fluctuación de la PAD 4, esto probablemente a la presencia de láminas beta, esto se observa frecuentemente cuando encontramos en las regiones iniciales.

Figura 17

RMSF de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns de la Proteína PAD4 y la Cl- Amidina



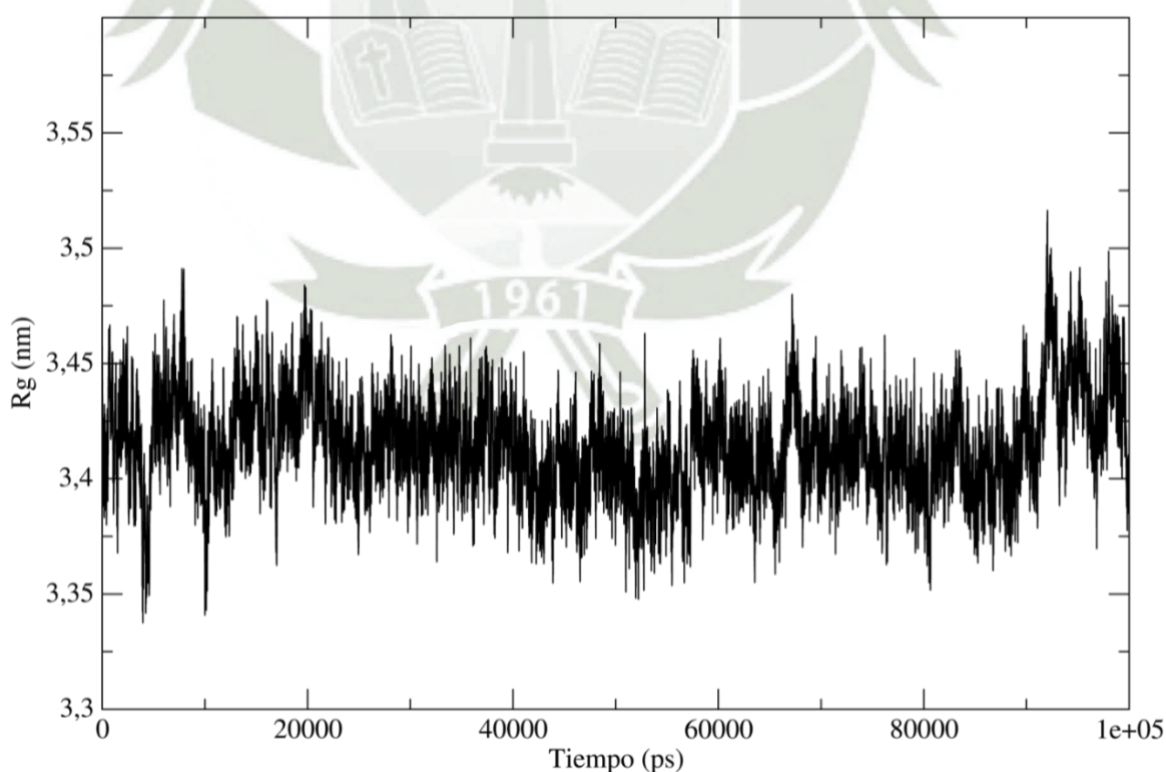
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener el Radio de Giro, nos brinda información de la naturalización o desnaturalización de las proteínas mediante la medida de un proceso de compactación, es decir que cuando el Radio de Giro disminuye la estructura puede estar caminando a un proceso de naturalización, y en el caso de que el Radio de Giro se incremente, entonces estamos frente a un proceso de desnaturalización o pérdida de estructura secundaria. Es así en nuestra simulación de dinámica molecular, encontramos que los 20ns la estructura inicia un proceso de naturalización, lo que se halla en concordancia con el grafico de RMSD, en forma similar a los 80ns hay un cambio conformacional que conduce a un proceso de naturalización probablemente de una región de la proteína, esto se aprecia en la figura 18, esto es observado debido a que el salto no es mayor a 0.05nm.

Figura 18

**Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns
de la Proteína PAD4**



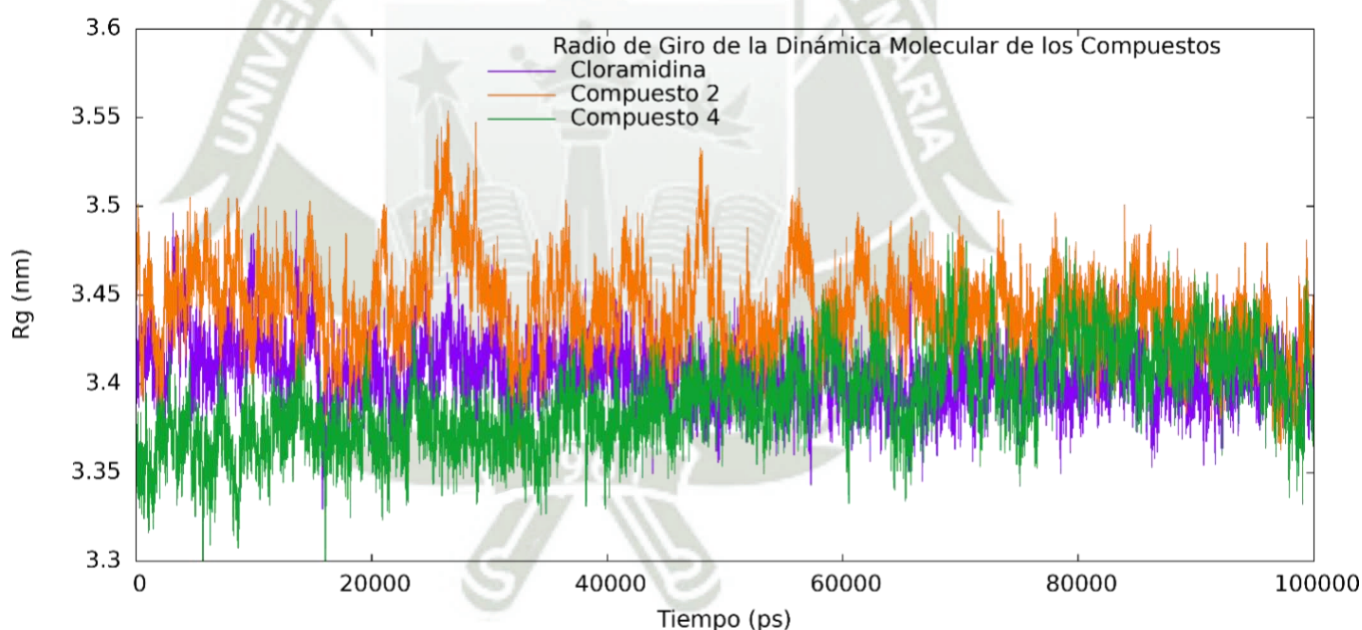
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener el Radio de Giro comparativo de los compuestos, se observa una diferencial en los primeros 40,000 ps con respecto a los tres compuestos, sin embargo la compactación de dichos compuestos se hace cada vez más uniforme a partir de los 50,000 ps a partir de los 100000 ps se observa el radio de giro tiende a ser más uniforme a comparación de la del inicio de la gráfica, cabe resaltar el radio de giro del compuesto 2 que llegó a un pico de 3.55 nm en los 30,000 ps luego, tiende a estabilizarse a partir de los 50,000 ps y a mantener un promedio de 3.4 a 3.45 nm con respecto a los demás compuestos.

Figura 19

**Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns
de los compuestos (Compuesto 2, Compuesto 4 y Cl-Amidina)**



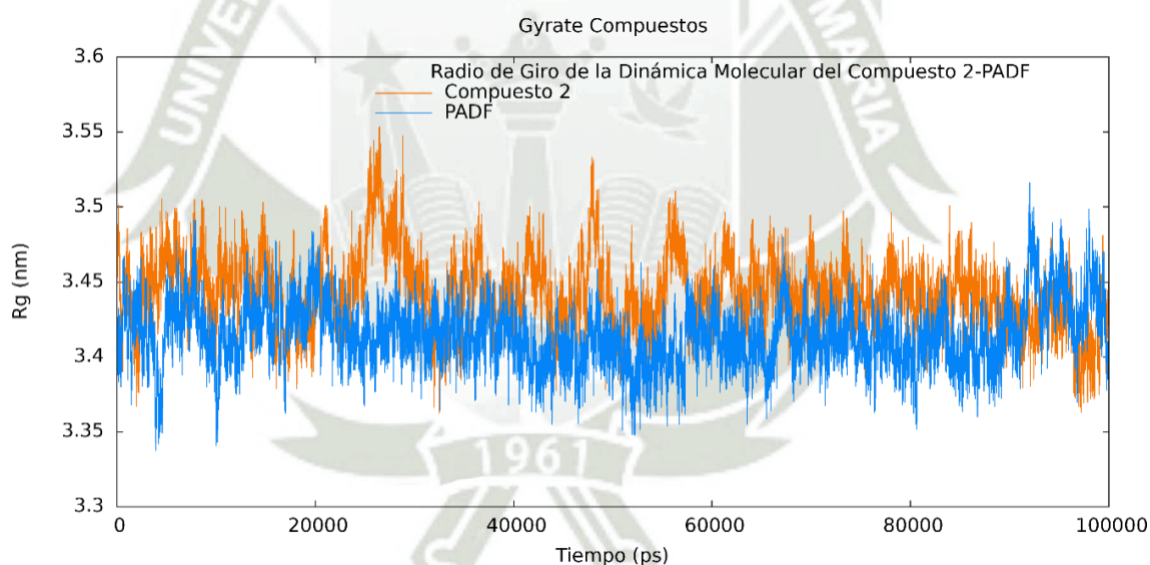
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener el Radio de Giro de la PAD4 y el Compuesto 2, se puede apreciar picos de 3.55 nm a nivel de los 20,000 ps así como un pico de 3.55 nm en los 50,000 ps, ello contrasta con la estabilidad promedio que posee la proteína base que va de un rango de 3.4 a 3.5 nm, lo cual puede ser un indicativo de qué hay una mayor actividad de plegamiento del compuesto 2 unido a la PAD4 con respecto a la PAD4 sin ningún compuesto la cual su comportamiento tiende a ser más estable.

Figura 20

**Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns
de la Proteína PAD4 y el Compuesto 2**

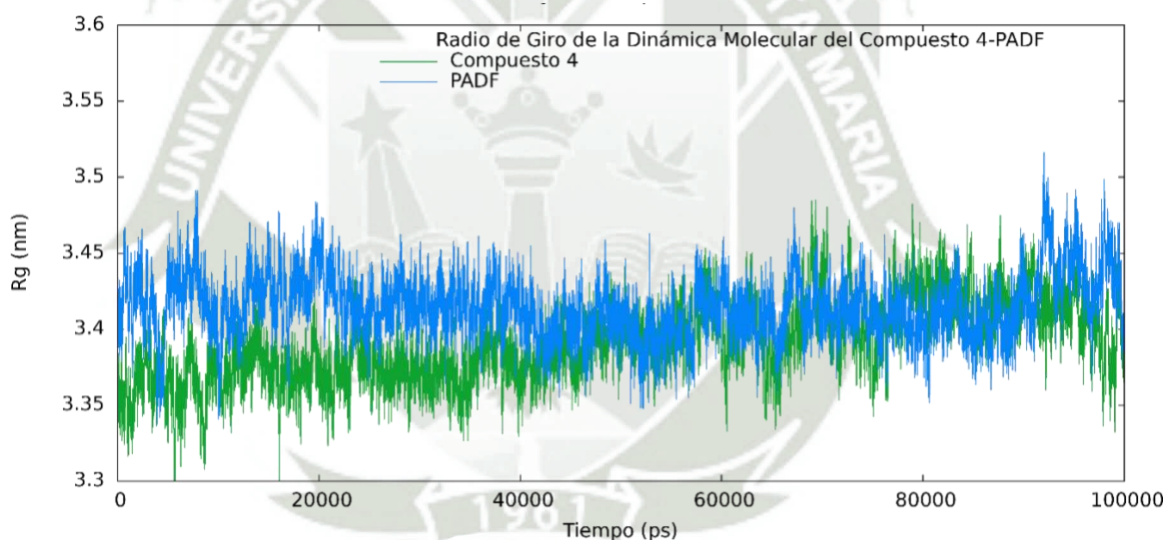


EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener el Radio de Giro de la PAD4 y el Compuesto 4, se observa un radio de giro de 3.3 a 3.4 nm en el caso de la proteína unida al compuesto 4 en relación a la PAD4 en su estado natural que se mantiene en un radio de giro de 3.4 a 3.45 nm, sin embargo la actividad se hace constante a partir de los 60000 ps, en los 90000 ps se observa nuevamente una disminución en radio de giro a comparación de la PAD4 en estado natural.

Figura 21

**Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns
de la Proteína PAD4 y el Compuesto 4**



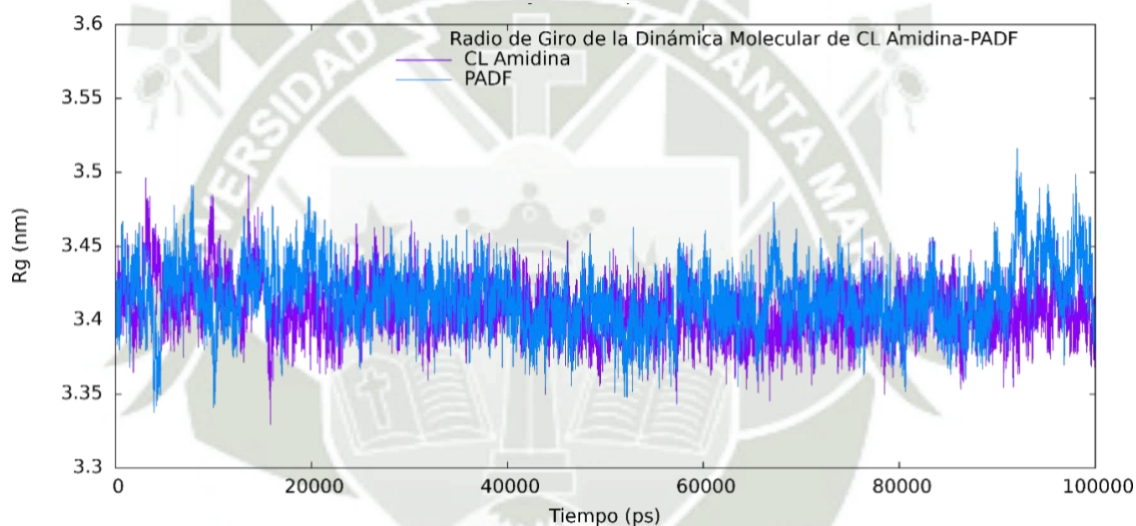
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener el Radio de Giro la PAD4 y la Cl-Amidina. Se aprecia un radio de giro de 3.4 a 3.5 nm, de la misma manera la proteína en su estado natural presenta en promedio el mismo rango de variabilidad, sin embargo, se pueden apreciar picos de energía constantes a lo largo de la presente dinámica molecular.

Figura 22

**Radio de Giro de la Simulación de Dinámica Molecular en un Ensamble NPT a 100ns
de la Proteína PAD4 y la Cl-Amidina**



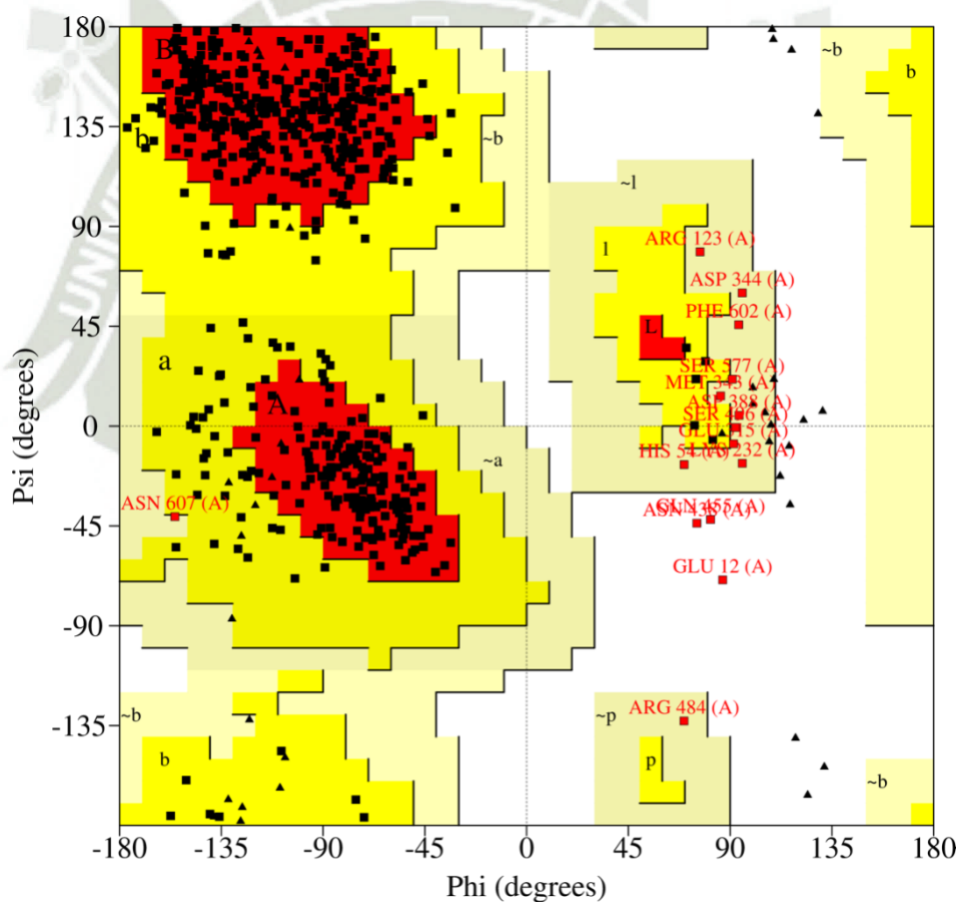
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Al obtener el Diagrama de Ramachandran de la PAD4 interactuando con el Compuesto 2 podemos observar un total de 664 residuos los cuales 470 se encuentra en regiones favorecidas, 86 en regiones permitidas y 3 residuos fuera de la región con un Zscore de -0.66 lo cual al ser un score alto nos indica una fuerte asociación de que esta unión es compatible con la vida y lograría los efectos deseados.

Figura 23

Diagrama de Ramachandran de la PAD4 interactuando con el compuesto 2



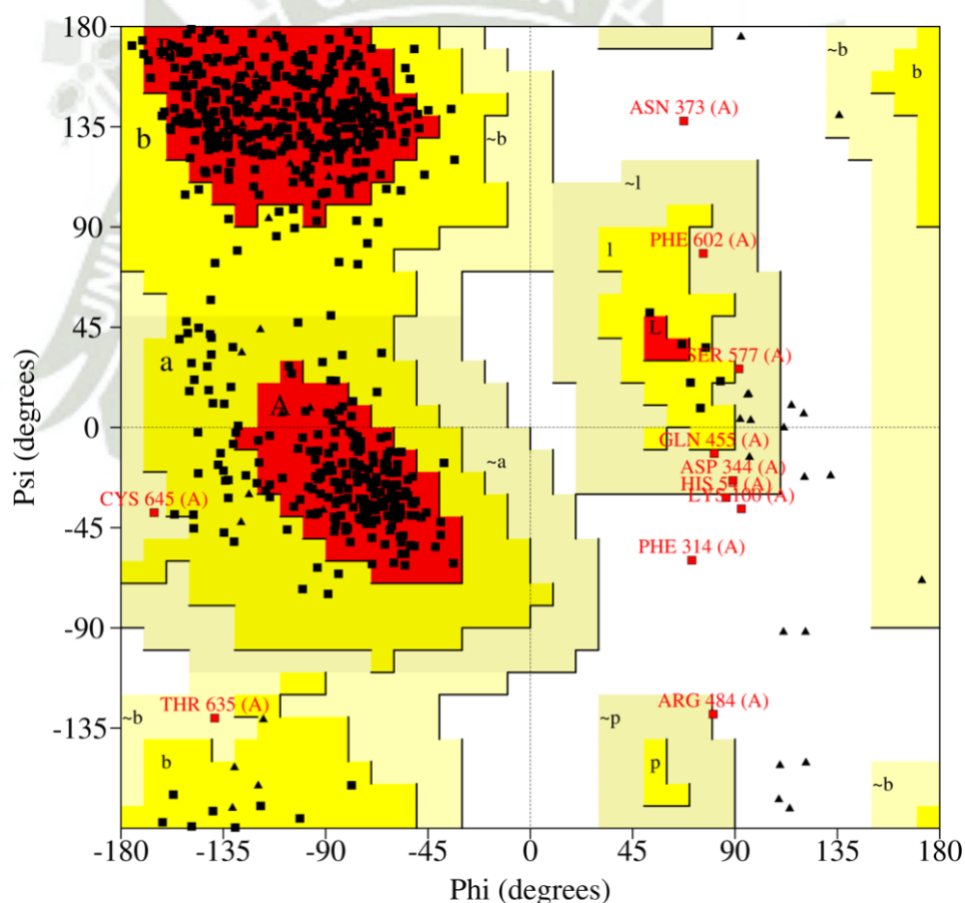
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Podemos observar un total de 664 residuos los cuales 477 se encuentra en regiones favorecidas, 83 en regiones permitidas y 5 residuos fuera de la región con un Zscore de -0.69 lo cual al ser un score alto nos indica una fuerte asociación de que esta unión es compatible con la vida y lograría los efectos deseados.

Figura 24

Diagrama de Ramachandran del compuesto 4 en interacción con la PAD4



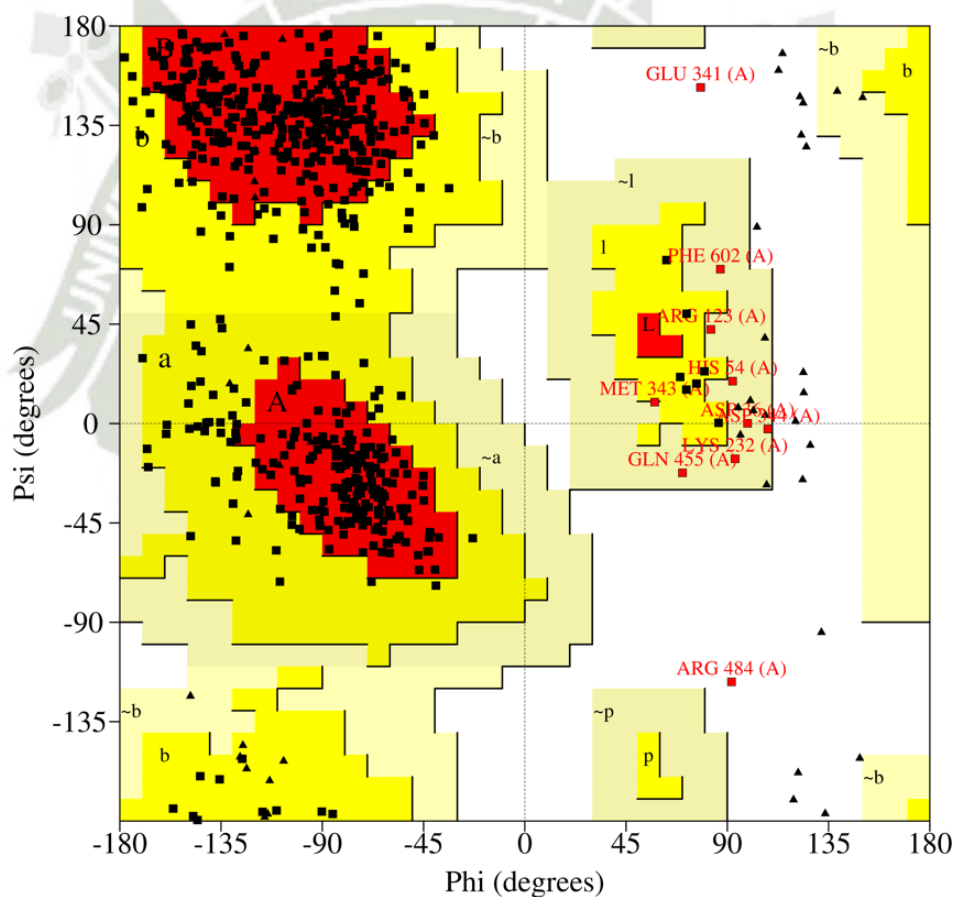
Fuente: Elaboración propia.

EVALUACIÓN IN SILICO DEL MECANISMO MOLECULAR DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA PEPTIDIL ARGININA DEIMINASA TIPO 4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Podemos observar un total de 664 residuos los cuales 451 se encuentra en regiones favorecidas, 110 en regiones permitidas y 2 residuos fuera de la región con un Zscore de -0.70 lo cual al ser un score alto nos indica una fuerte asociación de que esta unión es compatible con la vida y lograría los efectos deseados.

Figura 25

Diagrama de Ramachandran de la CL Amidina en interacción con la PAD4



Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

La artritis reumatoide es una enfermedad la cual va en aumento a nivel mundial, afecta a múltiples personas de los diversos estratos sociales ocasionando una incapacidad progresiva e irreversible de las articulaciones derivando en un deterioro del estado general, así como la independicancia del paciente.

Esta enfermedad se asocia a diversos factores de riesgo ya sean genéticos y ambientales así como las manifestaciones clínicas que pueda tener, se ha logrado establecer una escala de diagnóstico, sin embargo al pretender dilucidar el mecanismo fisiopatológico se estableció la existencia de los anticuerpos Anti Peptido citrulinado (Anti CCP) quienes son los responsables de desencadenar las diferentes cascadas inmunes involucradas en las manifestaciones clínicas de dicha enfermedad, en caso de ser dosados en un análisis hematológicos podremos ver que se encuentran en títulos elevados incluso muchos años antes de manifestar la etapa clínica de la artritis reumatoide.

Dentro del mecanismo fisiopatológico investigado se ha logrado establecer dianas terapéuticas dentro de este descubrimiento, en el presente trabajo nos enfocamos en la enzima Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 (PAD4), la cual es la enzima encargada de la formación de los Anti CCP por lo que se fabricaron diversos inhibidores de dicha proteína los cuales fueron descritos a nivel experimental, pero gracias a la bioinformática no solo se estableció el mecanismo de acción de dichos inhibidores sino el sitio activo de la proteína así como su interacción en condiciones fisiológicas por medio de la simulación de dinámica molecular.

Siendo nuestro objetivo de estudio el comportamiento de la PAD4 por su importante participación en la formación de los Anti CCP, se obtuvo esta estructura computacionalmente por medio de cristalización y para su conocimiento estructural se realizó a través de métodos de solución de resonancia magnética nuclear y microscópica electrónica para luego dicha recolección de datos sea subida al servidor de Protein Data Bank, gracias a los diferentes servidores computacionales en línea logramos establecer la mejor proteína que posea la estructura completa así como sus iones responsables de la interacción para la producción de anticuerpos.

Para evaluar su comportamiento en un medio compatible con los diferentes procesos fisiológicos llevados en el ser humano, se hizo una simulación de dinámica y evaluamos el movimiento así como el comportamiento sin encontrar mayores alteraciones, se logró

observar una proteína estable. Es importante definir el sitio activo de dicha proteína siendo el extremo N Terminal en la cual se encuentran iones de calcio involucrados de las interacciones de dicha proteína.

En los diferentes compuestos químicos que actúan como potenciales inhibidores al no ser sintetizados en algún servidor fueron fabricados por medio del Gaussian View, el cual se encarga de elaborar diversos compuestos químicos según los parámetros dados por el controlador. Al ser estructuras fabricadas en el mismo laboratorio no era necesario someterlas a reducción de energía ni simulación de dinámica molecular puesto que ya estaban preparadas para evaluar la dinámica del potencial interacción con la proteína

En el presente trabajo al hacer el modelamiento de la dinámica molecular de la proteína en estudio versus cada uno de los inhibidores hemos visto que hay una adecuada optimización de los mismos a la proteína sin embargo en el presente estudio se pudo ampliar más al respecto en lo que es la inhibición de dicha proteína en trabajos anteriores, por lo cual nos hemos apoyado de los diagramas del análisis y desviación media cuadrática (RMSD) al hacer una comparación de los tres componentes podemos observar que que son compuestos que están estables presentan ciertos picos de fluctuación sin embargo está dentro de la reacción esperada, ambos presentan una misma línea de energía lo cual demuestra de qué esos compuestos si se plantaría una replicación en trabajos a posterior tendrían una muy alta probabilidad de ser estables y lograr el efecto que se está demostrando. En el caso de la comparación de los diferentes inhibidores junto con la proteína en estudio se ha observado una disminución de la energía a comparación de la proteína libre con acoplamiento estable, lo cual nos podría dar un indicativo de la unión que se producen los inhibidores frente a la PAD4, cabe resaltar que las diferentes picos de fluctuaciones que se encuentran en cada una de las gráficas del RMSD están dentro del rango esperado lo cual nos puede indicar que es una reacción química estable. Es necesario para futuros estudios hacer una simulación en un tiempo más prolongado como pueden ser 500 ns y observar los diferentes picos que pueden ocurrir en esta dinámica molecular así como la estabilidad de la proteína.

Sin embargo en el tiempo que se ha utilizado para recopilar los resultados que han sido 100 ns podemos observar una reacción estable y una disminución marcada de la actividad de la proteína acoplado a los diferentes inhibidores. Por lo cual se sugiere para futuros estudios hacer una Dinámica con un mayor intervalo de tiempo para evaluar la estabilidad de la proteína unida a los diferentes compuestos evaluando las diferentes fluctuaciones que pueda presentar.

En el caso del análisis de las fluctuaciones cuadradas medias (RMSF) se analiza la fluctuación de los diferentes residuos, en un primer caso podemos observar que los tres diversos compuestos presentan fluctuaciones a nivel de los primeros 200 aminoácidos dichas fluctuaciones son constantes y están presentes en los tres primeros compuestos, sin embargo en los demás residuos podemos observar fluctuaciones tanto del compuesto como de la Cloroamidina.

En el caso de las comparaciones de la proteína en estudio junto a los diferentes compuestos podemos observar de igual manera que exista una fluctuación constante en los primeros 200 residuos, es un indicativo de la existencia de interacción especialmente en los primeros 200 aminoácidos que es donde se ubica centro activo de la proteína en estudio. Llama la atención en el caso de la Cloroamidina, la existencia de un pico de fluctuación a nivel del residuo número 400 en si nos indica que hay una liberación de energía.

En el caso de la proteína unida a los diversos compuestos que se podría traducir una actividad inhibitoria de los compuestos frente a la proteína, lo cual llega a validar la hipótesis del presente estudio al tener una unión tanto estable como una liberación de energía que se traduce en una gran probabilidad de inhibición de la proteína en estudio.

Al evaluar el radio de giro el cual evalúa la compactación y los diferentes movimientos que puede tener tanto la proteína como los compuestos a lo largo de la dinámica podemos observar de qué en los compuestos el radio de giro presenta una leve dispersión a nivel de los 40000 ps, sin embargo esta compactación se hace constante a partir de los 60000 ps.

En la comparación del radio de giro de los diferentes inhibidores junto a la proteína en estudio podemos observar de igual manera una leve dispersión en los primeros 20000 ps sin embargo está este movimiento se va haciendo constante a partir de los 60000 ps como se describieron en las imágenes anteriormente, por otro lado destaca el caso de la Cloroamidina que esta unión dicha compactación que ocurre tiende a ser constante desde el tiempo cero hasta el final de la medición por lo cual podemos encontrar la probabilidad de qué tiene una unión o una dinámica más estable acción de los diferentes compuestos. Lo que se plantea medir mediante este parámetro es la fuerza de unión que puede tener la proteína junto con los diversos inhibidores, así como el movimiento de aminoácidos que se traduce en una desnaturalización de la PAD4, por ende la unión tanto en el compuesto 2 como en el compuesto 4 tiende a ser levemente dispersa en la primera mitad de la dinámica sin embargo se refuerza y llega a estabilizarse en la segunda mitad de la dinámica y en el caso de la

Cloroamidina es una unión y movimiento constante a lo largo de la dinámica de radio de giro, se puede afirmar a continuación la actividad inhibitoria de los compuestos traducida en la probable desnaturalización de la PAD4.

En el análisis de ramachandran podemos observar que más del 70% de los residuos de los diferentes compuestos se encuentran en regiones favorables con lo cual podemos afirmar que existe una alta probabilidad que los diferentes compuestos puede ser replicados en estudios in vivo además de que la unión de la proteína con los diferentes compuestos se mantendría estable a lo largo de la prueba.

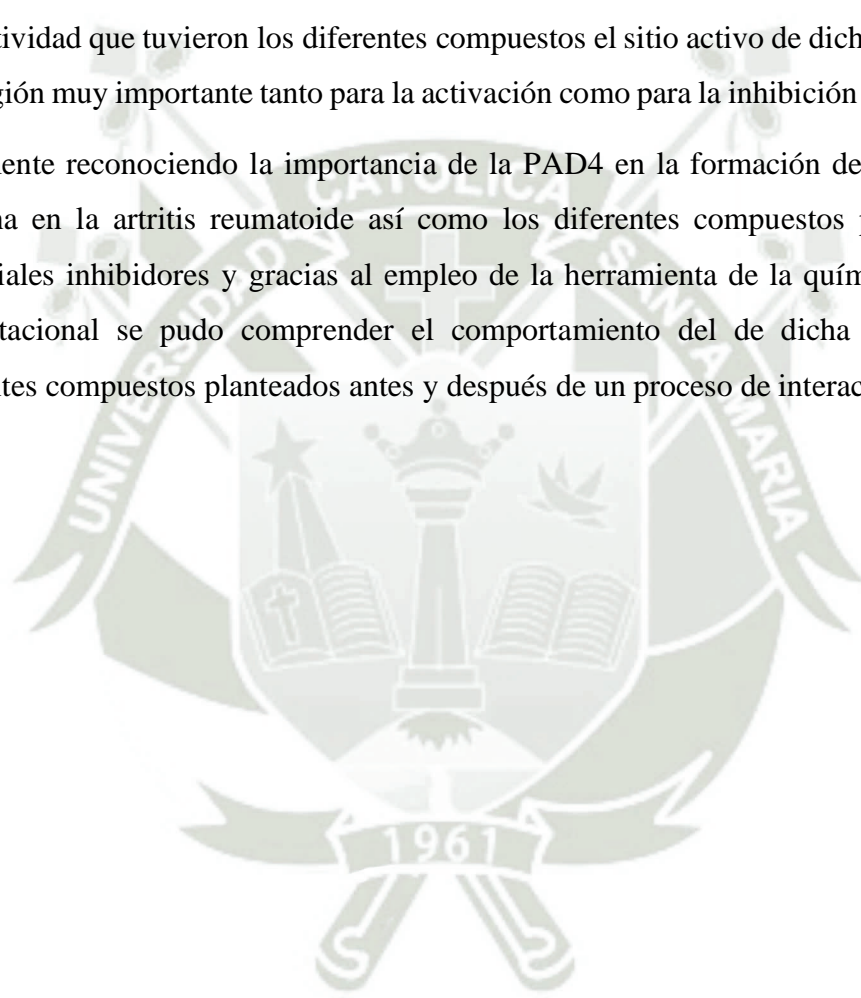
Las pruebas in silico permiten analizar el acoplamiento entre proteínas o proteínas con compuestos químicos, realizando la simulación de dinámica molecular además que nos permite regular las propiedades fisicoquímicas. En las enfermedades reumatoides degenerativas como lo es la artritis reumatoide la PAD4 presenta una actividad importante en la formación de los Anti CCP, por ello el inhibir esta proteína se plantea como una nueva diana terapéutica. A través de dichos estudios in silico los diferentes inhibidores planteados se dirigen a la proteína la cual ha sido modelada y minimizada para un adecuado estudio donde tienen una especificidad precisa y se une al principio activo de la misma mediante esta unión se puede controlar la tasa de activación Lograr lo que es una inhibición de la misma.

Los estudios de nuevos potenciales fármacos en este tipo de enfermedades están en continuo desarrollo debido a los diversos enfoques de selección además de la optimización molecular de diversos compuestos, el descubrimiento de la formación de los Anti CCP por las diversas vías planteadas fue un importante paso en el desarrollo de nuevos fármacos para descubrir nuevas alternativas de tratamiento que incluso podría llevarse de la mano con lo que es la terapia inmunológica siendo esta el último recurso que se tiene en caso de pacientes con una sintomatología muy grave además del objetivo principal que es inhibir la formación de estos anticuerpos anti citrulina, la cual juega un rol muy importante previo a la manifestación clínica de la enfermedad incluso en estadios tempranos.

Es importante considerar el modelamiento de estas proteínas al ser uno de los principales desencadenantes y precursor de los Anti CCP los cuales son los responsables de la cascada patógena en la enfermedad de artritis reumatoide. Si bien es cierto existen terapias con anticuerpos monoclonales que bloquean las diferentes vías de activación de la cascada inmune, nosotros planteamos un nuevo objetivo terapéutico que a diferencia de la terapia

biológica ya conocida, se estaríamos efectivizando el potencial tratamiento en uno de los estadios clínicos tempranos de la artritis reumatoide, es necesario plantear que existen diferentes vías que promueven la formación de los anticuerpos sin embargo al descubrirse esta proteína precursora en el ciclo de producción de estos anticuerpos y gracias a los conocimientos de el modelado y fabricación estructural de esta proteína podemos dilucidar la importancia de la misma además de simular una interacción ante potenciales futuros nuevos fármacos adicionalmente, logramos identificar por medio de la revisión bibliográfica y la actividad que tuvieron los diferentes compuestos el sitio activo de dicha proteína siendo una región muy importante tanto para la activación como para la inhibición de dicha enzima.

Finalmente reconociendo la importancia de la PAD4 en la formación de anticuerpos anti citrulina en la artritis reumatoide así como los diferentes compuestos planteados como potenciales inhibidores y gracias al empleo de la herramienta de la química con biología computacional se pudo comprender el comportamiento del de dicha proteína, de los diferentes compuestos planteados antes y después de un proceso de interacción molecular.



CONCLUSIONES

PRIMERA Las interacciones moleculares de Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 y los diferentes inhibidores sintéticos contra dicha proteína, a través de herramientas computacionales, demostraron que se dan de forma espontánea y con una liberación de energía, así como fluctuaciones de la estabilidad de dicha proteína, lo cual nos indica una fuerte posibilidad de lograr la inhibición de la misma.

SEGUNDA Se logró la reducción y mejora de las estructuras en un entorno celular simulado mediante herramientas informáticas, permitiendo la estabilidad molecular y la optimización de la capacidad estructural de los modelos estudiados.

TERCERA Se estableció el sitio activo de la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4, el cual se encuentra en los primeros 200 aminoácidos de la proteína. Lo cual nos indica una fuerte posibilidad de lograr la inhibición de la misma. Se concluye en la evaluación in silico que sí existen interacciones moleculares entre la Peptidil Arginina Deiminasa tipo 4 y los diferentes inhibidores químicos planteados frente a dicha proteína, con un alto acoplamiento y modificación estructural de la proteína. Esta investigación permitiría continuar el campo de estudio para evaluar la posibilidad de desarrollo de nuevos y potenciales fármacos inhibidores para el tratamiento de la enfermedad de artritis reumatoide.

RECOMENDACIONES

PRIMERA Se recomienda aumentar la duración de los cálculos de dinámica molecular en futuros experimentos con el fin de obtener un análisis más exhaustivo de los comportamientos moleculares.

SEGUNDA Se recomienda la investigación continua de potenciales inhibidores contra la Peptidil Arginina Deiminasa tipo IV para ampliar el conocimiento acerca de el principio activo, así como el comportamiento de dicha proteína con la posibilidad de ser aplicada en futuras investigaciones.

TERCERA Se recomienda replicar los estudios con el objetivo de profundizar en la evaluación de la Peptidil Arginina Deiminasa tipo IV, para que posteriormente los nuevos métodos terapéuticos puedan ser aplicados in vivo en los pacientes con artritis reumatoide

CUARTA Se sugiere ampliar la investigación en estudios exploratorios in silico que posibiliten la predicción y simulación de comportamientos estructurales, así como el análisis de las propiedades fisicoquímicas de los modelos estructurales. Estos modelos podrían convertirse en herramientas prometedoras para el tratamiento de la artritis reumatoide.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tracey G. Prescribing in practice I Rheumatoid arthritis. 2017;(June):13–8.
2. Narváez J. Tratamiento de la artritis reumatoide. Med Clin (Barc) [Internet]. 2016;147(4):176–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2016.03.005>
3. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. Ann Rheum Dis. 2014;73(7):1316–22.
4. Chandrashekara S, Shobha V, Dharmanand BG, Jois R, Kumar S, Mahendranath KM, et al. Reduced incidence of extra-articular manifestations of RA through effective disease control: Karnataka Rheumatoid Arthritis Comorbidity (KRAC) study. Int J Rheum Dis. 2017;20(11):1694–703.
5. Sanmartí R, Cabrera-Villalba S, Gómez-Puerta JA, Ruiz-Esquide V, Hernández MV, Salvador G, et al. Palindromic rheumatism with positive anticitrullinated peptide/protein antibodies is not synonymous with rheumatoid arthritis. A longterm followup study. J Rheumatol. 2012;39(10):1929–33.
6. Turesson C, Jacobsson LTH, Sturfelt G, Matteson EL, Mathsson L, Rönnelid J. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2007;66(1):59–64.
7. Aliko A, Kamińska M, Falkowski K, Bielecka E, Benedyk-Machaczka M, Malicki S, et al. Discovery of novel potential reversible peptidyl arginine deiminase inhibitor. Int J Mol Sci. 2019;20(9).
8. Ormseth MJ, Lipson A, Alexopoulos N, Hartlage GR, Oeser AM, Bian A, et al. Association of epicardial adipose tissue with cardiometabolic risk and metabolic syndrome in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Care Res. 2013;65(9):1410–5.
9. Yan S, Cui Y, Zhang X, Zhang G, Dong G, Feng Y, et al. The incidence of extra-articular manifestations in southern Chinese patients with inflammatory joint diseases. Int J Rheum Dis. 2019;22(9):1686–94.
10. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2010;62(9):2569–81.

11. Fraenkel L, Bathon JM, England BR, St.Clair EW, Arayssi T, Carandang K, et al. 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res.* 2021;73(7):924–39.
12. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet* [Internet]. 2010;376(9746):1094–108. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60826-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60826-4)
13. Harrison BJ, Silman AJ, Symmons DPM. Does the age of onset of rheumatoid arthritis influence phenotype?: A prospective study of outcome and prognostic factors (multiple letters). *Rheumatology.* 2000;39(1):112–3.
14. Gist AC, Guymer EK, Eades LE, Leech M, Littlejohn GO. Fibromyalgia remains a significant burden in rheumatoid arthritis patients in Australia. *Int J Rheum Dis.* 2018;21(3):639–46.
15. Theander L, Nyhäll-Wahlin BM, Nilsson JA, Willim M, Jacobsson LTH, Petersson IF, et al. Severe extraarticular manifestations in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis: Risk factors and incidence in relation to treatment with tumor necrosis factor inhibitors. *J Rheumatol.* 2017;44(7):981–7.
16. Sparks JA. In the Clinic® rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2019;170(1):ITC1–15.
17. Sayah A, English JC. Rheumatoid arthritis: A review of the cutaneous manifestations. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(2):191–209.
18. Panchagnula R, Rajiv SR, Prakash J, Chandrashekara S, Suresh KP. Role of anticyclic citrullinated peptide in the diagnosis of early rheumatoid factor-negative suspected rheumatoid arthritis: Is it worthwhile to order the test? *J Clin Rheumatol.* 2006;12(4):172–5.
19. Wu CY, Yang HY, Lai JH. Anti-citrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis: Biological effects and mechanisms of immunopathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):1–23.
20. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* [Internet]. 2016;388(10055):2023–38. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
21. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, Van Tuyl LHD, Funovits J, et al. American college of rheumatology/European league against rheumatism provisional definition of

- remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):573–86.
22. Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O’Fallon WM, et al. Survival in rheumatoid arthritis: A population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):54–8.
 23. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LTH, Goronzy JJ, Petersson IF, et al. The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(6).
 24. Venrooij WJ Van, Pruijn GJM. Citrullination : a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis Walther J van Venrooij and Ger J M Pruijn. *Arthritis Res.* 2000;2–4.
 25. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LT, Goronzy JJ, Petersson IF, et al. Association of HLA-C3 and smoking with vasculitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(9):2776–83.
 26. Alvarez I, Collado J, Daura X, Colomé N, Rodríguez-García M, Gallart T, et al. The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*1001) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1630–9.
 27. Stokes MB, Foster K, Markowitz GS, Ebrahimi F, Hines W, Kaufman D, et al. Development of glomerulonephritis during anti-TNF-alpha; therapy for rheumatoid arthritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(7):1400–6.
 28. Guellec D, Cozien S, Ruysse-Witrand A, Dieudé P, Saraux A. Prevalence and clinical significance of extra-articular manifestations at diagnosis in the ESPOIR cohort with recent-onset arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2020;50(3):409–13.
 29. Turesson C, Matteson EL. Management of extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(3):206–11.
 30. Klop C, De Vries F, Bijlsma JWJ, Leufkens HGM, Welsing PMJ. Predicting the 10-year risk of hip and major osteoporotic fracture in rheumatoid arthritis and in the general population: An independent validation and update of UK FRAX without bone mineral density. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(12):2095–100.
 31. Sant SM, Tormey VJ, Freyne P, Casey EB. Lymphatic obstruction in Rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 1995;14(4):445–50.

32. Moment AT. Distinctions Between Diagnostic and Classification Criteria? *Rohit*. 2019;2018–9.
33. Schoels M, Knevel R, Aletaha D, Bijlsma JWW, Breedveld FC, Boumpas DT, et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: Results of a systematic literature search. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(4):638–43.
34. De Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YPM, Verpoort KN, Schreuder GMT, Ewals JAPM, Terwiel JP, et al. Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: Association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies. *Arthritis Rheum*. 2008;58(5):1293–8.
35. Koh JH, Jung SM, Lee JJ, Kang KY, Kwok SK, Park SH, et al. Radiographic structural damage is worse in the dominant than the non-dominant hand in individuals with early rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2015;10(8):1–13.
36. Shahouri SH, Michaud K, Mikuls TR, Caplan L, Shaver TS, Anderson JD, et al. Remission of rheumatoid arthritis in clinical practice: Application of the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism 2011 remission criteria. *Arthritis Rheum*. 2011;63(11):3204–15.
37. Arita K, Shimizu T, Hashimoto H, Hidaka Y, Yamada M, Sato M. Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 de abril de 2006;103(14):5291–6.
38. Ge C, Xu B, Liang B, Lönnblom E, Lundström SL, Zubarev RA, et al. Structural Basis of Cross-Reactivity of Anti-Citrullinated Protein Antibodies. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. febrero de 2019;71(2):210–21.
39. Ge C, Tong D, Liang B, Lönnblom E, Schneider N, Hagert C, et al. Anti-citrullinated protein antibodies cause arthritis by cross-reactivity to joint cartilage. *JCI Insight*. 6 de julio de 2017;2(13):e93688, 93688.
40. Kongpachith S, Lingampalli N, Ju CH, Blum LK, Lu DR, Elliott SE, et al. Affinity Maturation of the Anti-Citrullinated Protein Antibody Paratope Drives Epitope Spreading and Polyreactivity in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(4):507–17.
41. Pathogenic Citrulline-Multispecific B Cell Receptor Clades in Rheumatoid Arthritis. [citado 7 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40590>
42. Vergroesen RD, Slot LM, Hafkenscheid L, Koning MT, van der Voort EIH, Grooff CA, et

- al. B-cell receptor sequencing of anti-citrullinated protein antibody (ACPA) IgG-expressing B cells indicates a selective advantage for the introduction of N-glycosylation sites during somatic hypermutation. *Ann Rheum Dis.* junio de 2018;77(6):956-8.
43. Courbon G, Rinaudo-Gaujous M, Blasco-Baque V, Auger I, Caire R, Mijola L, et al. *Porphyromonas gingivalis* experimentally induces periodontitis and an anti-CCP2-associated arthritis in the rat. *Ann Rheum Dis.* mayo de 2019;78(5):594-9.
44. Sugawara E, Kato M, Kudo Y, Lee W, Hisada R, Fujieda Y, et al. Autophagy promotes citrullination of VIM (vimentin) and its interaction with major histocompatibility complex class II in synovial fibroblasts. *Autophagy.* mayo de 2020;16(5):946-55.
45. Lloyd KA, Wigerblad G, Sahlström P, Garimella MG, Chemin K, Steen J, et al. Differential ACPA Binding to Nuclear Antigens Reveals a PAD-Independent Pathway and a Distinct Subset of Acetylation Cross-Reactive Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2018;9:3033.
46. Yuzhalin AE, Gordon-Weeks AN, Tognoli ML, Jones K, Markelc B, Konietzny R, et al. Colorectal cancer liver metastatic growth depends on PAD4-driven citrullination of the extracellular matrix. *Nat Commun.* 14 de noviembre de 2018;9(1):4783.
47. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.* 7 de marzo de 2017;23(3):279-87.
48. Janssen KMJ, de Smit MJ, Withaar C, Brouwer E, van Winkelhoff AJ, Vissink A, et al. Autoantibodies against citrullinated histone H3 in rheumatoid arthritis and periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* junio de 2017;44(6):577-84.
49. Gabarrini G, Chlebowicz MA, Vega Quiroz ME, Veloo ACM, Rossen JWA, Harmsen HJM, et al. Conserved Citrullinating Exoenzymes in *Porphyromonas* Species. *J Dent Res.* mayo de 2018;97(5):556-62.
50. Kawalkowska J, Quirke AM, Ghari F, Davis S, Subramanian V, Thompson PR, et al. Abrogation of collagen-induced arthritis by a peptidyl arginine deiminase inhibitor is associated with modulation of T cell-mediated immune responses. *Sci Rep.* 23 de mayo de 2016;6:26430.
51. Willis VC, Banda NK, Cordova KN, Chandra PE, Robinson WH, Cooper DC, et al. Protein arginine deiminase 4 inhibition is sufficient for the amelioration of collagen-induced arthritis. *ClinExp Immunol.* mayo de 2017;188(2):263-74.

52. Vanommeslaeghe K, Guvench O, MacKerell AD, Jr. Molecular Mechanics. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2014 Jun 4 [cited 2023 Jan 28];20(20):3281. Available from: [/pmc/articles/PMC4026342/](#)
53. Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror RO, Shaw DE. How fast-folding proteins fold. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Oct 28 [cited 2023 Jan 24];334(6055):517–20. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/334/6055/517>
54. 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*. 2015;1–2:19–25.
55. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol*. 2012;857:231–57.
56. Martínez L. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. Kleinjung J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2023 Jan 24];10(3):e0119264. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119264>
57. Rudin A, Choi P. Practical Aspects of Molecular Weight Measurements. In: *The Elements of Polymer Science & Engineering*. Elsevier; 2013. p. 89–148.
58. Kaisler S, Armour F, Espinosa JA, Money W. Big data: Issues and challenges moving forward. *Proc Annu Hawaii Int Conf Syst Sci*. 2013;995–1004.
59. Aljawarneh S, Anguera A, Atwood JW, Lara JA, Lizcano D. Particularities of data mining in medicine: lessons learned from patient medical time series data analysis. *Eurasip J Wirel CommunNetw* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Jan 28];2019(1):1–29. Available from: <https://jwcn-eurasipjournals.springeropen.com/articles/10.1186/s13638-019-1582-2>
60. Rana M. Bioinformatics Shape Personalized Medicine: A Perspective. Vol. 12, *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*. 2020.
61. Payghan P V., Bera I, Bhattacharyya D, Ghoshal N. Computational studies for structurebased drug designing against transmembrane receptors: PLGICs and class a GPCRs. *Front Phys*. 2018 Sep 25;6(SEP):52.
62. Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* [Internet]. 1998 Aug 31 [cited 2023 Jan 16];81(8):3684. Available from: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.448118>

63. Huang CC, Meng EC, Morris JH, Pettersen EF, Ferrin TE. Enhancing UCSF Chimera through web services. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jul 1;42(W1).
64. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank [Internet]. Vol. 28, *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press; 2000 [cited 2023 Jan 24]. p. 235–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10592235/>
65. Burley SK, Berman HM, Bhikadiya C, Bi C, Chen L, Di Costanzo L, et al. RCSB Protein Data Bank: Biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2019 Jan 8 [cited 2023 Jan 24];47(D1): D464–74. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D464/5144139>
66. Wilkinson MD, Dumontier M, Aalbersberg IJ, Appleton G, Axton M, Baak A, et al. Comment: The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data [Internet]*. 2016 Mar 15 [cited 2023 Jan 24];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26978244/>
67. Hussein HA, Borrel A, Geneix C, Petitjean M, Regad L, Camproux AC. PockDrugServer: A new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2015 Jul 1 [cited 2023 Jan 24];43(W1):W436–42. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/43/W1/W436/2467926>
68. Borrel A, Regad L, Xhaard H, Petitjean M, Camproux AC. PockDrug: A model for predicting pocket druggability that overcomes pocket estimation uncertainties. *J Chem Inf Model [Internet]*. 2015 Apr 27 [cited 2023 Jan 24];55(4):882–95. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci5006004>
69. Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. Efficient unbound docking of rigid molecules. In: *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics) [Internet]*. Springer Verlag; 2002 [cited 2023 Jan 24]. p. 185–200. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-45784-4_14
70. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2005 Jul 1 [cited 2023 Jan 24];33(SUPPL. 2):W363–7. Available from: https://academic.oup.com/nar/article/33/suppl_2/W363/2505698

71. Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins Struct Funct Bioinforma* [Internet]. 2007 Jun 27 [cited 2023 Jan 24];69(1):139–59. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.21495>
72. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, De Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by C α geometry: ϕ, ψ and C β deviation. *Proteins Struct Funct Genet* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2023 Jan 24];50(3):437–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.10286>
73. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2023 Jan 24];35(SUPPL.2):407–10. Available from: https://academic.oup.com/nar/article/35/suppl_2/W407/2920938.
74. Wu CY, Yang HY, Lai JH. Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Patients with Rheumatoid Arthritis: Biological Effects and Mechanisms of Immunopathogenesis. *Int J Mol Sci*. 4 de junio de 2020;21(11):4015.
75. Aliko A, Kamińska M, Falkowski K, Bielecka E, Benedyk-Machaczka M, Malicki S, et al. Discovery of Novel Potential Reversible Peptidyl Arginine Deiminase Inhibitor. *Int J Mol Sci*. 2 de mayo de 2019;20(9):2174.
76. Luo Y, Arita K, Bhatia M, Knuckley B, Lee YH, Stallcup MR, et al. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization. *Biochemistry*. 3 de octubre de 2006;45(39):11727-36.
77. Willis VC, Gizinski AM, Banda NK, Causey CP, Knuckley B, Cordova KN, et al. N- α -benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de abril de 2011;186(7):4396-404.
78. Pavan M, Menin S, Bassani D, Sturlese M, Moro S. Qualitative Estimation of Protein–Ligand Complex Stability through Thermal Titration Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Inf Model* [Internet]. 31 de octubre de 2022 Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00995>
79. M Fulbabu, Jonniya NA, Roy R, Kar P. Unraveling the Molecular Mechanism of Recognition of Selected Next-Generation Antirheumatoid Arthritis Inhibitors by Janus Kinase 1. *ACS Omega* [Internet]. 9 de febrero de 2022;7(7):6195-209. Disponible

en: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06715>.

80. Tran QH, Nguyen QT, Vo NQ, Mai TT, Tran TT, Tran TD, Le MT, Trinh DT, Thai KM. Structure-based 3D-Pharmacophore modeling to discover novel interleukin 6 inhibitors: An in silico screening, molecular dynamics simulations and binding free energy calculations. PLOS ONE [Internet]. 6 de abril de 2022 ;17(4):e0266632. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266632>
81. Mejia-Gutierrez M, Vásquez-Paz BD, Fierro L, Maza JR. In Silico Repositioning of Dopamine Modulators with Possible Application to Schizophrenia: Pharmacophore Mapping, Molecular Docking and Molecular Dynamics Analysis. ACS Omega [Internet]. 1 de junio de 2021 ;6(23):14748-64. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05984>
82. Alvarez Valdivia, Maria Gracia. Evaluación in silico de interacciones de anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos sobre la proteína beta-amiloide en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. 2022.

