



Revista Colombiana de Química
ISSN: 0120-2804
ISSN: 2357-3791
rcolquim_fcbog@unal.edu.co
Universidad Nacional de Colombia
Colombia

Acoplamiento molecular y modelado tridimensional por homología de flavonoides derivados de amentoflavona con las neuraminidasas H1N1 y H5N1 del virus de gripe aviar

Vivas Reyes, Ricardo; Morales, Alejandro; Márquez Lázaro, Johana; Varela, Roger; Herrera, Leandro; Vivas Gómez, Catalina

Acoplamiento molecular y modelado tridimensional por homología de flavonoides derivados de amentoflavona con las neuraminidasas H1N1 y H5N1 del virus de gripe aviar

Revista Colombiana de Química, vol. 50, núm. 3, 2021

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309071959005>

Acoplamiento molecular y modelado tridimensional por homología de flavonoides derivados de amentoflavona con las neuraminidasas H1N1 y H5N1 del virus de gripe aviar

Molecular docking and three-dimensional homology modeling of flavonoids derived from amentoflavone with H1N1 and H5N1 neuraminidases of avian influenza virus

Modelagem de homologia tridimensional e de acoplamiento molecular de flavonóides derivados de amentoflavona com as neuraminidasas H1N1 e H5N1 do vírus da gripe aviária

Ricardo Vivas Reyes
Universidad de Cartagena, Colombia
rvivasr@unicartagena.edu.co

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309071959005>

Alejandro Morales
Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco,
Colombia

Johana Márquez Lázaro
Institución Universitaria Rafael Núñez, Colombia

Roger Varela
Universidad de Cartagena, Colombia

Leandro Herrera
Universidad de Cartagena, Colombia

Catalina Vivas Gómez
Universidad de Cartagena, Colombia

Recepción: 22 Julio 2021
Revisado: 18 Noviembre 2021
Aprobación: 25 Enero 2022

RESUMEN:

El virus de la influenza A es el responsable de la gripe aviar, condición patológica que afecta principalmente aves, caballos y mamíferos marinos, sin embargo, el subtipo H5N1 tiene la capacidad de infectar a los humanos de forma rápida, exponiéndolos a un posible evento pandémico. Por tanto, el objetivo de este estudio fue realizar el acoplamiento molecular y modelado tridimensional por homología de flavonoides derivados de amentoflavona con las neuraminidasas H1N1 y H5N1 del virus de gripe aviar. Inicialmente, se obtuvo por homología la estructura 3D de la neuraminidasa H1N1. Seguido, se realizó un acoplamiento molecular de H1N1 con seis ligandos (F36, Ginkgetin, 3S,3R, 5S,5R, 6S y 6R), y más adelante H5N1 y los ligandos F36, Ginkgetin, 5R y 6R. Finalmente, a los complejos obtenidos se les realizó un análisis de interacciones. Los resultados dejaron en evidencia una relación entre la actividad inhibitoria y las interacciones tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas formadas entre el sitio activo de las neuraminidasas y los ligandos. Además, se observó una mejora en la actividad inhibitoria de los ligandos para la estereoquímica tipo R y sustituyentes poco voluminosos. De ahí que se propongan la evaluación experimental de los ligandos 5R y 6R como potenciales inhibidores de H5N1.

PALABRAS CLAVE: homología, acoplamiento molecular, neuraminidasas, H1N1, H5N1, flavonoides.

NOTAS DE AUTOR

rvivasr@unicartagena.edu.co

ABSTRACT:

The influenza A virus is responsible for bird flu; a pathological condition that mainly affects birds, horses, and marine mammals, however, the H5N1 subtype can infect humans quickly; exposing them to a possible pandemic event. Therefore, the objective of this study was to carry out the molecular docking and three-dimensional homology modeling of flavonoids derived from amentoflavone with H1N1 and H5N1 neuraminidases of the avian influenza virus. Initially, the 3D structure of H1N1 neuraminidase was obtained by homology. Then, the molecular docking of H1N1 was carried out with six ligands (F36, Ginkgetin, 3S, 3R, 5S, 5R, 6S, and 6R), and subsequently H5N1 and F36, Ginkgetin, 5R, and 6R ligands. Finally, an interaction analysis of the protein-ligand complex was performed. The results showed a relationship between the inhibitory activity of ligands and the hydrophobic and hydrogen bridge-type interactions. In addition, an improvement in the inhibitory activity of the ligands for R-type stereochemistry and small bulky substituents was observed. Thus, the experimental evaluation of the 5R and 6R ligands as potential H5N1 inhibitors is proposed.

KEYWORDS: Homology, Molecular docking, neuraminidases, H1N1, H5N1, flavonoids.

RESUMO:

O vírus influenza A é responsável pela gripe aviária; condição patológica que afeta principalmente pássaros, cavalos e mamíferos marinhos, no entanto, o subtipo H5N1 tem a capacidade de infectar humanos rapidamente; assim, expondo-os a um possível evento pandêmico. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar o acoplamento e modelagem de homologia tridimensional de flavonóides derivados da amentoflavona com as neuraminidases H1N1 e H5N1 do vírus da influenza aviária. Inicialmente, a estrutura 3D da neuraminidase H1N1 foi obtida por homologia. Em seguida, o acoplamento molecular de H1N1 foi realizado com seis ligantes (F36, Ginkgetin, 3S, 3R, 5S, 5R, 6S e 6R) e, posteriormente, H5N1 e os ligantes F36, Ginkgetin, 5R e 6R. Finalmente, uma análise de interação foi realizada nos complexos obtidos. Os resultados mostraram uma relação entre a atividade inibitória e as interações hidrofóbicas e do tipo ponte de hidrogênio formadas entre o sítio ativo das neuraminidases e os ligantes. Além disso, foi observada uma melhoria na atividade inibitória dos ligantes para a estereoquímica do tipo R e pequenos substituintes volumosos. Assim, é proposta a avaliação experimental dos ligantes 5R e 6R como potenciais inibidores do H5N1.

PALAVRAS-CHAVE: Homologia, acoplamento, neuraminidases, H1N1, H5N1, flavonóides.

Introducción

Existen reportes históricos desde tiempos inmemorables de muchas clases de pandemias que han azotado a la humanidad y que han dejado como consecuencia una serie de disrupciones en la cotidianidad de las personas, además de muerte y desolación. Particularmente, en los últimos años y en especial desde casi del principio del siglo XXI ha habido una serie de pandemias relacionadas con virus [1,2]. A la fecha, vivimos una pandemia ocasionada por el virus del SARS-CoV-2, un virus perteneciente a la familia de los coronavirus y causante de la enfermedad COVID-19, situación que ha conllevado a un despliegue interdisciplinar para la búsqueda de vacunas y tratamiento de la enfermedad [3,4].

Una infección muy parecida a la que vivimos actualmente, pero con menores consecuencias es la gripe aviar, que tuvo unos orígenes muy parecidos a la COVID-19 [5]. La gripe aviar es una infección causada por el virus de la influenza aviar o virus de la influenza A (H5N1); este microorganismo se presenta de forma natural en las aves y es capaz de infectar una variedad de animales incluyendo humanos, cerdos, caballos, mamíferos marinos y por supuesto aves [6]. Los virus de la influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae y se distribuyen en tres géneros: influenza virus A, influenza virus B e influenza virus C, que corresponden a los virus de influenza tipo A, B y C, respectivamente. La diferencia principal entre los géneros radica en las variaciones antigénicas en la proteína de la matriz y de la nucleoproteína que se utilizan para la caracterización del virus y que son específicas para cada género [6]. El genoma de los virus A está formado por 8 piezas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, es decir, no pueden ser traducidos directamente a la proteína. Las secuencias de los extremos de cada RNA están conservadas entre sí entre todos los virus tipo A, y son parcialmente complementarias. Cada segmento de RNA está asociado a la polimerasa viral, que es un complejo de tres subunidades distintas, PB1, PB2 y PA, mediante interacción con los extremos del RNA y está protegido por asociación a monómeros de la nucleoproteína (NP), uno de los componentes mayoritarios en el virión [7].

En la superficie del virión, e insertadas en su membrana, se encuentran dos glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), cuya estructura determina los subtipos serológicos que podemos definir entre los virus gripales tipo A. Así, existen 16 subtipos diferentes de HA (H1-H16) y 9 de NA (N1-N9). Además, en el virión existen cantidades pequeñas de otra proteína denominada M2, que constituye un canal iónico dependiente del pH del medio y NEP, que está implicada en la exportación de vRNPs del núcleo [7]. Además de las proteínas citadas, los virus gripales tipo A expresan otras proteínas importantes para su replicación o su interacción con el huésped, que no están presentes en la partícula viral; la proteína NS1 une RNA de doble cadena, modula la replicación viral y es esencial para bloquear la respuesta celular a la infección, que está mediada por interferón [8]. La proteína PB1-F2 parece modular la apoptosis o muerte celular programada como consecuencia de la infección [9].

La HA es el mayor determinante antigénico de los virus de la influenza A y B, al cual están dirigidos los anticuerpos neutralizantes, por lo tanto, es el componente crucial de las vacunas actuales utilizadas para el control de la influenza. Esta proteína, una vez activada de manera enzimática por proteasas del tracto respiratorio, es la responsable de la unión del virus a sus receptores celulares de ácido siálico (Neu5Ac) y de la fusión de la envoltura viral con la membrana citoplasmática de la célula diana, procesos que determinarán la penetración del núcleo cápsula en el interior celular [10,11]. Generalmente, el virus de la influenza aviar (AI) no infecta a los humanos, debido a la respuesta primaria que presentan a la infección, como los receptores celulares específicos. No obstante, el virus puede cruzar ocasionalmente las barreras de la especie e infectar directamente a los humanos, incluyendo a las cepas altamente patógenas que pueden causar una enfermedad fatal [12,13,14]. El subtipo H5N1 tiene la capacidad de cruzar la barrera entre las especies aviar y humana, por lo que este virus es considerado potencialmente pandémico; sus ancestros son virus aviares altamente patógenos encontrados previamente en pollos, gansos y patos de China [15]. De ahí, la necesidad de la búsqueda de moléculas inhibitoras para la neuraminidasa de este virus.

Por otra parte, autores como Miki y Col (2007), han evaluado la actividad inhibitoria de flavonoides sobre la neuraminidasa de H1N1, debido a que estos son capaces de unirse a dicha proteína [16,17,18]. En este sentido, este estudio tiene por objetivo realizar el acoplamiento molecular y modelado tridimensional por homología de flavonoides derivados de amentoflavona con las neuraminidasas H1N1 y H5N1 del virus de gripe aviar. Además, cabe señalar que la metodología usada en el presente estudio responde a la serie de preguntas planteadas en esta investigación [19-22].

Materiales y métodos

Conjunto de estudio y diseño de estructuras

Para este trabajo se emplearon como moléculas base biflavonoides derivados de la amentoflavona, tomadas de los trabajos reportados por [23,24], quienes emplearon *Ginkgo biloba L.* y *Cephalotaxus harringtonia K.* para su extracción. Seguido, las estructuras fueron dibujadas y diferentes configuraciones relativas R y S fueron obtenidas para aquellas moléculas sustituidas con ácido siálico (Gauss View 3.09). Con el propósito de obtener las moléculas energéticamente favorables se realizó una optimización empleando el método semiempírico AMP, incorporado en el programa Gaussian 09. Las ocho moléculas seleccionadas se muestran en la Figura 1 y en la Tabla 1 se indican sus actividades inhibitorias expresadas como IC50 para la neuraminidasa de la cepa A/PR/8/34 (H1N1) [17].

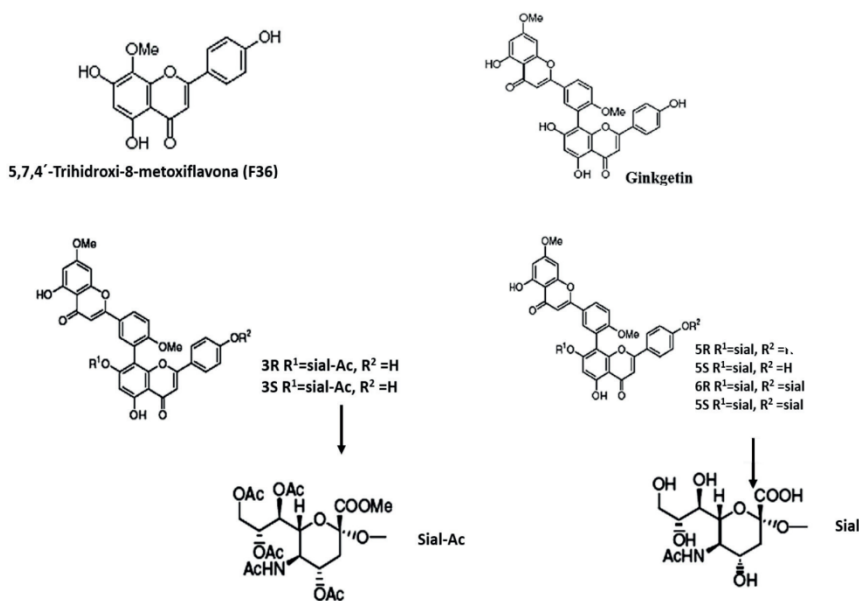


FIGURA 1.
Estructuras de las moléculas seleccionadas para el estudio.

Obtención de estructuras tridimensionales de las proteínas H5N1 y H1N1

Inicialmente se realizó una búsqueda exhaustiva de las proteínas de interés en la Protein Data Bank (PDB), obteniendo así la estructura cristalográfica de la proteína A/Vietnam/1203/04 (H5N1) con código 2HTY y resolución de 2,5 Å [25]. Sin embargo, para la cepa A/PR/8/34 (H1N1) no se encontró una estructura cristalográfica disponible, razón por la cual se hizo necesario predecir la estructura 3D mediante la realización de un modelo tridimensional teórico. Para esto se obtuvo la estructura primaria en formato FASTA de la neuraminidasa del virus de influenza A (H1N1) en la base de datos de la NCBI, código de acceso NP_040981 [26]. En seguida, se hizo la búsqueda de homólogos en la PDB usando el algoritmo de alineamiento BLAST [27] y posterior alineamiento secuencial con el servidor Clustal W [28]. Las estructuras secundarias fueron predichas con servidor Sympred [28] y la estructura 3D de H1N1 se obtuvo con los servidores de modelado por homología Swiss Model, Geno 3D y 3D-Jigsaw. También, se calculó el RMSD de los modelos obtenidos empleando el programa Swiss.pdb.Viewer (Deep View), opción Magic Fit, en la cual los carbonos alfa de los modelos son superpuestos con los de la estructura molde.

Para la optimización del modelo elegido se utilizó el campo de fuerza Tripos, con la asignación de las cargas de Gasteiger-Marsili en gradiente conjugado disponible en el módulo de *composer* del paquete de programa Sybyl 7.3. El solvente se adicionó de manera implícita (constante dieléctrica de 78) y los todos los hidrógenos fueron añadidos a la estructura. Por último, la evaluación de la estructura del modelo se realizó teniendo en cuenta tres componentes: 1) Potencial (servidores Eval23D, Verify3D, Prosa II y EvTree); 2) estereoquímica (servidor imoltalk) y 3) normalidad (servidor ProSA- Web).

TABLA 1
Inhibición de neuraminidasa de la cepa A/PR/8/34 (H1N1)

Ligandos	IC ₅₀ (mg/mL)
F36	9,78
Ginkgetin	55,00
3R	79,20
3S	> 100
5R	5,50
5S	6,35
6R	6,61
6S	6,99

Acoplamiento molecular de H1N1 y los ligandos biflavonoides

El acoplamiento molecular entre la proteína H1N1 seleccionada y los ligandos bajo estudio se realizó en el programa FlexX incorporado en SYBYL 7.3. Para esto, se extrajo una porción de la proteína la cual incluyó el sitio activo y residuos de aminoácidos cercanos a este en un radio de 6,5Å. Los puentes de hidrogeno seleccionados estuvieron en el rango de 2,7 a 3,1Å y ángulos entre 120°-180°, debido a que son valores favorables [29].

El análisis de las interacciones se llevó a cabo con el servidor LPC/SCU y para la visualización del complejo se empleó el programa Pymol. Para cada uno de los cálculos se realizó el análisis estadístico denominado Rank by Rank (Total score, D-Score, G-Score, PMF-Score y CHEM-Score), el cual permitió escoger el complejo energéticamente más favorable y, por tanto, la mejor pose para cada ligando.

Acoplamiento molecular entre H5N1 NA y los ligandos biflavonoides (diferente proteína)

A diferencia del acoplamiento molecular con H1N1, el estudio proteína-ligando con H5N1 NA se llevó a cabo con cuatro ligandos, debido a que solo tres de ellos mostraron alta potencia inhibidora (F36, 5R, 6R) y en el caso de Ginkgetin, a pesar de no ser un buen inhibidor, fue seleccionado como elemento de comparación.

Resultados y discusión

Obtención de la estructura tridimensional de la neuraminidasa H1N1

La búsqueda de la estructura primaria en NCBI de la H1N1 reportó una proteína humana compuesta por 454 aminoácidos y con peso molecular de 50,14 KDa (código NP_040981) (26). La composición de aminoácidos arrojada por el programa ProtParam (27) indicó que la serina (11,2%), la glicina (9,7%) y la isoleucina (9,0%) eran los aminoácidos más abundantes, mientras que la metionina (1,5%), la histidina (2,2%), la glutamina (2,4%) y la alanina (3,5%) estaban en baja proporción.

Por su parte, la búsqueda por homología en la PDB (algoritmo Blast) reportó una sola neuraminidasa de tipo N1, que coincidió con la H5N1 considerada en este estudio (PDB: 2HTY). El alineamiento de las secuencias procedentes de H1N1 y H5N1 mostró un porcentaje de identidad del 88%, valor que muestra la alta conservación de la estructura primaria en ambas proteínas, así como la utilidad del método para la predicción de estructuras terciarias. Además, al comparar las secuencias de ambas proteínas en torno al sitio activo se encontraron 11 aminoácidos altamente conservados (Figura 2).

```

H1N1 68 VILTGSS LCPiRGWAIY SKDNSIRIGS KGDVfVIREP FISCShLECR
H5N1 83 VKLAGSS LCPiNGWAVY SKDNSIRIGS KGDVfVIREP FISCShLECR

H1N1 116 TFFLIQGALL NDRHSNGTVK DRSPYRALMS CPVGEAPSPY NSRFESVAWS
H5N1 131 TFFLIQGALL NDKHSNGTVK DRSPHRTLMS CPVGEAPSPY NSRFESVAWS

H1N1 166 ASACHDGMGW LTIGISGPDN GAVAVLKYNG IITETIKSWR KKILRTQESE
H5N1 180 ASACHDGTsw LTIGISGPDN GAVAVLKYNG IITDTIKSWR NNILRTQESE

H1N1 216 CACVNGSCFT IMTDGpSDGL ASYKIFKIEK GKVTkSIELN APNSHYEECS
H5N1 230 CACVNGSCFT VMTDGpSNGQ ASYKIFKMEK GKVVkSVELD APNYHYEECS

H1N1 266 CYPDTGKVMC VCRDNWHGSN RPWVSFDQNL DYQIGYICSG VFGDNPRPKD
H5N1 280 CYPNAGEITC VCRDNWHGSN RPWVSFNQNL EYQIGYICSG VFGDNPRPND

H1N1 316 GTGSCGPVYV DGANGVKGFS YRYGNGVWIG RTKSHSSRHG FEMIWDPNGW
H5N1 331 GTGSCGPVSS NGAYGKGFs FKYGNGVWIG RTKSTNSRSG FEMIWDPNGW

H1N1 366 TETDSKFSVR QDVVAMTDWS GYSGSFVQHP ELTGLDCIRP CFWVELIRGR
H5N1 384 TETDSSFSVK QDIVAITDWS GYSGSFVQHP ELTGLDCIRP CFWVELIRGR

H1N1 416 PKEKTIWTSa SSISFCGVNS DTVDWSWPDG AELPFTI
H5N1 431 PKESTIWTSg SSISFCGVNS DTVGWSWPDG AELPFTI
    
```

FIGURA 2

Alineamiento secuencial entre H1N1 y H5N1. Los aminoácidos conservados se muestran en color rojo.

La predicción de la estructura secundaria de H1N1 mostró una composición del 6,83% en hélices alfa; 36,56% en hojas betas y 56, 61% en estructuras irregulares, evento que hace inferir una estructura poco definida. Estos resultados concuerdan con la composición porcentual de aminoácidos, en que los residuos involucrados en la formación de hélices alfa están en baja proporción (Met, His, Ala y Gln) mientras que los participantes en giros como la glicina están en alta proporción. Por su parte, el diagrama de Ramachandran (Figura 3) corrobora esta información al indicar la presencia de aminoácidos en regiones permitidas para hélices alfa y hojas betas.

En aras de obtener la estructura 3D de H1N1 se utilizó como plantilla la cadena A de la H5N1 (PDB: 2HTY) y los servidores de modelado por homología Swiss Model, Geno 3D y 3D-Jigsaw, los modelos obtenidos se muestran en la Figura 4.

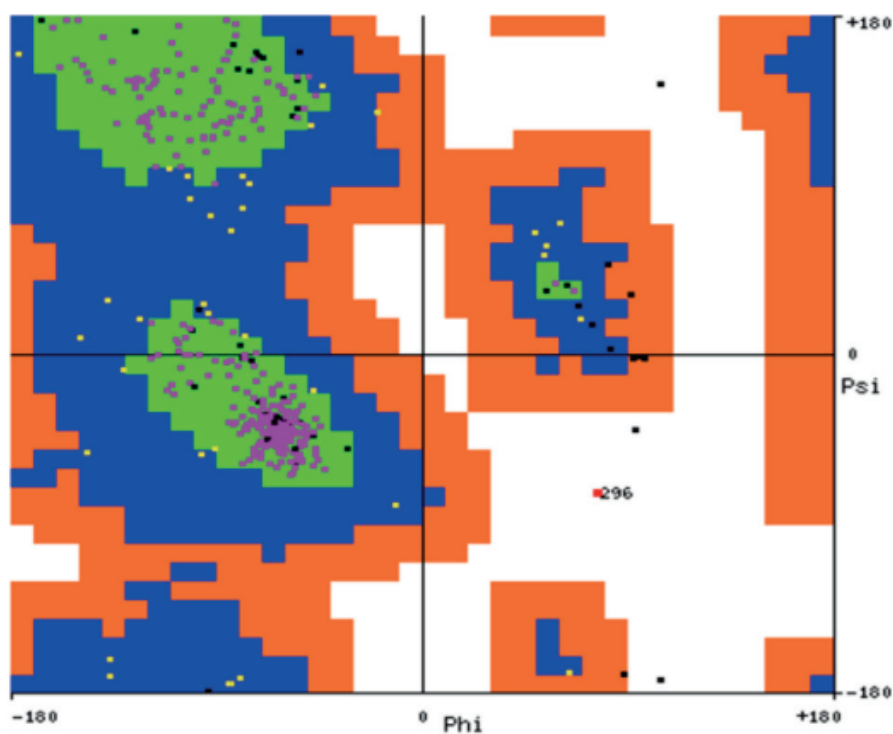


FIGURA 3

Diagrama de Ramachandran para la secuencia de H1N1. Se observa que la estructura secundaria de esta proteína contiene básicamente hélices alfa y hojas beta, las cuales pueden incluir giros.

Como se muestra en la Figura 4, los tres modelos obtenidos evidencian una pequeña porción de hélices alfa en comparación a las hojas beta, así como una gran proporción de estructuras secundarias aleatorias como era de esperarse. El análisis de identidad de los tres modelos fue superior al 80%, por tanto, cualquiera de los tres modelos es viable para ensayos de acoplamiento molecular. No obstante, con el propósito de encontrar la mejor geometría se empleó como criterio la presencia de puentes disulfuro conservados en la estructura, así solo el modelo generado por Swiss Model mantuvo dichas interacciones igual al molde.

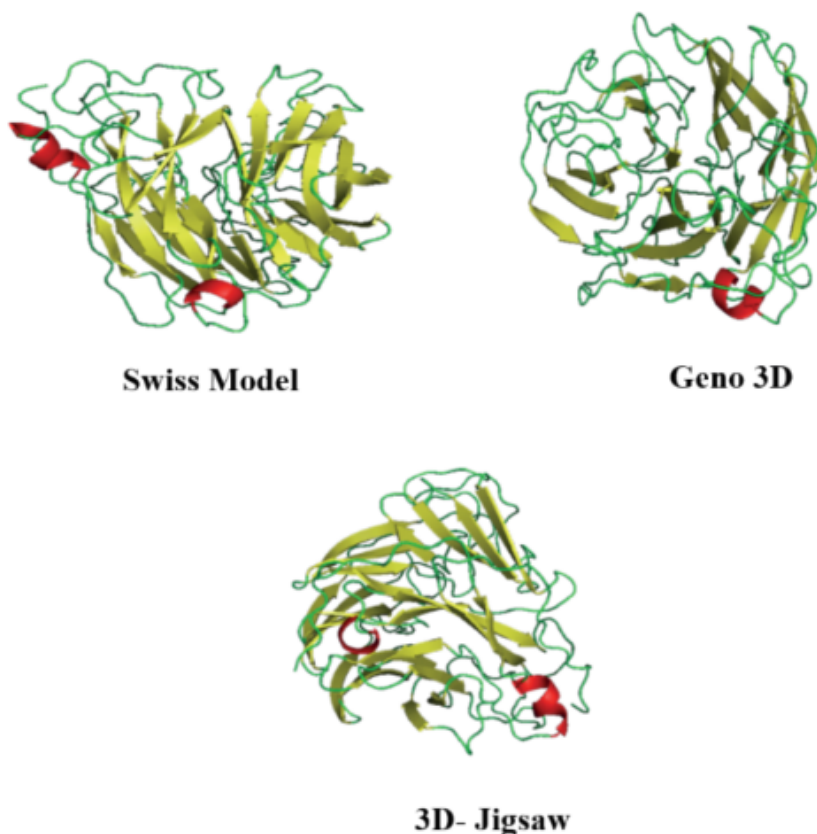


FIGURA 4

Modelos obtenidos por diversos servidores de modelado por homología. En cada caso se muestra la cadena principal y las cadenas laterales, hojas beta (amarillo), hélices alfa (rojo), *loops* (verde).

Por otro lado, el RMSD (Tabla 2) de los modelos obtenidos deja ver que 3D-Jigsaw presenta un valor óptimo, sin embargo, la energía es muy alta, lo que indica que no se favorece la estabilidad de la estructura. Por tanto, el modelo de Swiss continúa siendo la mejor opción debido a que tiene una mejor geometría y estabilidad con respecto a los otros modelos.

TABLA 2
Cálculo de RMSD y energía para los modelos obtenidos

Modelo	Molde	RMSD(Å)	Energía (KJ/mol)
Swissmodel.pdb	2HTY	0,07	-14.633,341
geno.pdb	2HTY	1,13	-13.067,107
3djigsaw.pdb	2HTY	0,25	6.274,353

La evaluación del modelo a través de los potenciales evidenció que Swiss Model, en tres de los cuatro programas utilizados (Eval23D, Verify3D y EvTree), mostró tener una estructura 3D óptima (Tabla 3).

TABLA 3
Evaluación del Swiss Model empleando los programas Eval23D, Verify3D, Prosa II y EvTree

PDB	Eval23D	Verify3D	Prosa II	EvTree
Swissmodel.pdb	0,091	0,305	-	0,203

Los valores de evaluación van de -1 a 1 y son ilustrados con una franja de colores que va desde el rojo hasta el blanco para geometrías no favorables y desde el blanco hasta el verde para geometrías óptimas.

La evaluación de calidad por estereoquímica indicó también la estabilidad tanto del modelo como del molde (2HTY) (Tabla 4). Los valores mayores al 90% indican las regiones favorecidas del diagrama de Ramachandran, considerando la estereoquímica Phi-Psi. Además, la tabla 3 muestra que en el Swiss Model no presentó ningún aminoácido con una conformación inconcebible, mientras que para el 2HTY solo un aminoácido adoptó dicha conformación, no obstante, este no hace parte del sitio activo ni es un residuo cercano. También, la calidad del modelo por normalidad (Z-score) mostró que la estructura generada por el Swiss Model y el molde están dentro de los Z-score de las proteínas nativas reportadas en la Protein Data Bank. Por tanto, todos los parámetros considerados en la evaluación del molde y el Swiss Model indicaron su estabilidad y geometría favorable para su utilización en los ensayos de acoplamiento molecular.

TABLA 4
Porcentajes de los residuos en las distintas regiones para el molde y el modelo

Molécula	Residuos en núcleo y permitida	Residuos en núcleo	Residuos en la región permitida	Residuos en la región generosa	Residuos en la región no permitida
Swissmodel.pdb	100,0%	72,5% (235)	27,5% (89)	0,0% (0)	0,0% (0)
2HTY	98,5%	79,9% (258)	18,6% (60)	1,2% (4)	0,3% (1)

Acoplamiento molecular de ligandos - neuraminidasa H1N1

Con el propósito de explicar los resultados del acoplamiento molecular se considera la nomenclatura de los ligandos mostrada en la Figura 5.

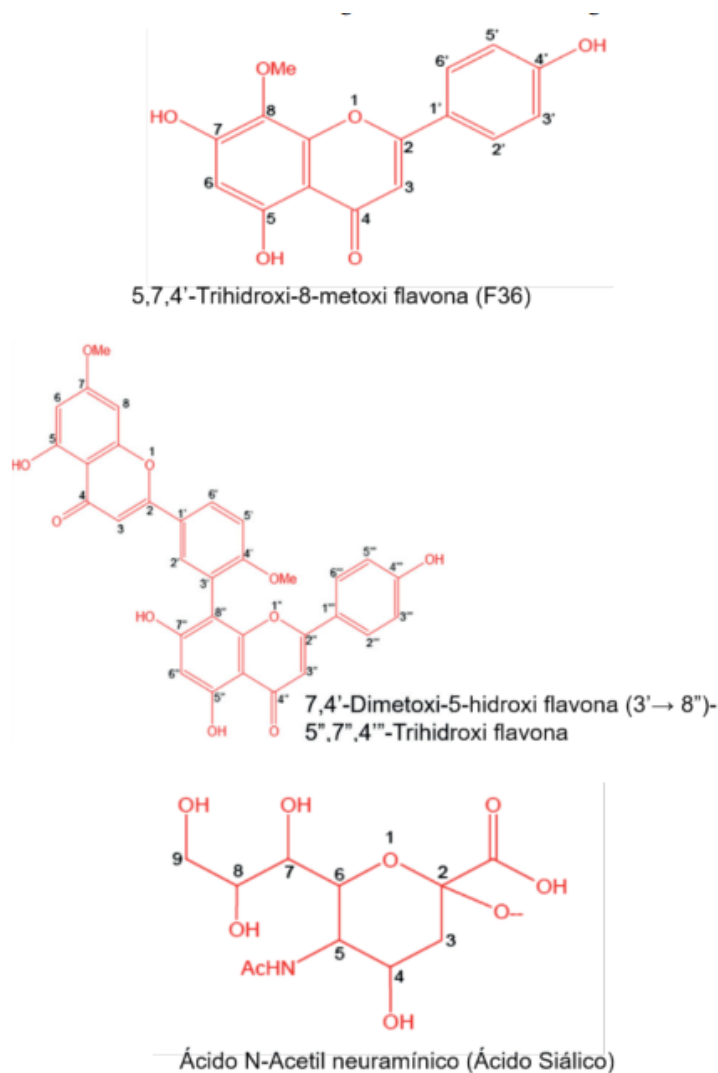


FIGURA 5
Nomenclatura de la estructura base de la biflavonas bajo estudio

Complejos neuraminidasa H1N1-F36 y H1N1- Ginkgetin

Al analizar el complejo H1N1-F36 se observa la formación de seis puentes de hidrógeno, los cuales están distribuidos entre el sitio activo (Arg278 y Tyr387) y el resto de la cavidad (Arg141 y Asn329) (figura 6a). El ligando F36 forma dos puentes de hidrógeno con los grupos NH₂ de Arg278, uno con el radical OCH₃ en C8 y el otro con el radical OH en C7. El residuo Asn329 lo hace a través del grupo carbonilo y átomo de hidrogeno del radical OH en C7, quien a su vez hace otro puente con el grupo NH₂ de este residuo, por tanto, la importancia del radical OH-C7 en la estabilización del complejo. Por su parte, el residuo Tyr387 del sitio activo forma un puente de hidrógeno con O1 del anillo de pirona de F36 mientras que Arg141 lo hace a través del grupo NH₂ y el O del radical OH en C4'. También, el complejo H1N1-F36 se estabiliza con las interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático del ligando y los residuos de Arg103, Asp136 y Leu119.

En el caso de Ginkgetin adoptó una conformación poco favorable dentro del sitio activo de H1N1, debido a que solo una parte de este ingresó a la cavidad (Figura 6b). Este hecho podría entonces explicar su baja capacidad inhibitoria (Tabla 1). Al analizar las interacciones se observó que Ginkgetin formó cinco puentes de hidrógeno, siendo el más relevante el establecido entre Arg353 (sitio activo) y el grupo carbonilo de C4, así mismo, este grupo también interactuó con Asn329. Los demás puentes se formaron con Asn280, Glu263

y Thr423 y los grupos OH del ligando. Por otro lado, a diferencia del complejo H1N1-F36, este presenta solo una interacción de tipo hidrofóbico (Arg353), lo cual corrobora su baja estabilidad dentro del sitio activo.

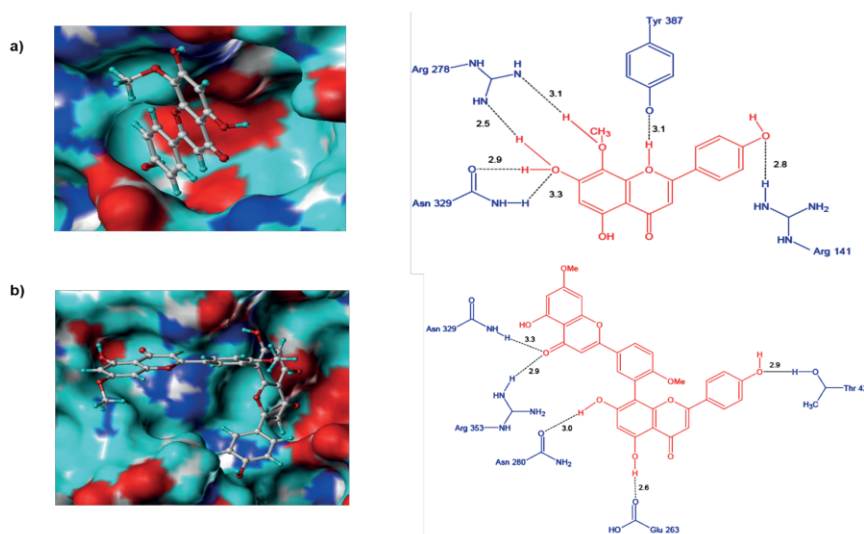


FIGURA 6
Conformación de los ligandos e interacciones entre el sitio activo de la neuraminidasa H1N1 y a) F36 y b) Ginkgetin.

Complejos neuraminidasa H1N1-3R y H1N1-3S

Al revisar la conformación del ligando 3R dentro de la proteína H1N1, se observó que su contacto principal fue a través del sustituyente de ácido siálico acetilado, quedando por fuera la parte biflavonoide; situación que es de esperarse debido al gran volumen de 3R (Figura 7). Las pocas interacciones de este complejo se establecieron mediante cuatro puentes de hidrógeno formados entre Arg278, Arg353 y el oxígeno de C7", Arg278, Tyr378 y el sustituyente ácido siálico acetilado, mientras que las interacciones hidrofóbicas se presentaron con los residuos Pro416, Thr423 y Glu262 como se muestra en la Figura 7.

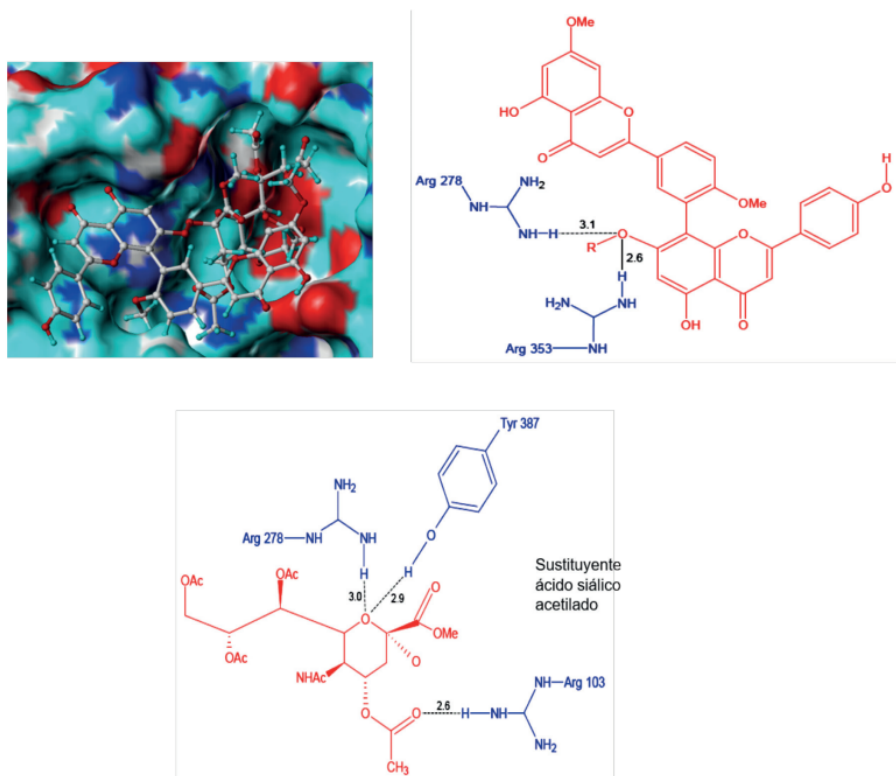


FIGURA 7

Conformación de los ligandos e interacciones entre el sitio activo de la neuraminidasa H1N1 y el ligando 3R.

Además, se encontraron interacciones de tipo repulsivas, lo cual corrobora su desfavorable acople e indica la posible razón de su baja actividad inhibitoria (Tabla 1). Por su parte, el ligando 3S no se acopló al sitio activo de H1N1, hecho que evidenció la baja estabilidad del complejo y por tanto su pésima actividad inhibitoria.

Complejos neuraminidasa H1N1-5R y H1N1-5S

El ligando 5R, a diferencia de los mencionados, ingresa completamente al sitio activo de H1N1; situación que brinda una mayor estabilidad al complejo (Figura 8a). La interacción entre 5R y H1N1 se da a través de la formación de nueve puentes de hidrógeno de los cuales cuatro son con la parte biflavonoide y cinco con el sustituyente ácido siálico acetilado. La parte biflavonoide interactúa con dos residuos del sitio activo (Arg103 y Asp136) mientras que el ácido siálico acetilado con tres (Arg278, Arg353 y Tyr387), como se muestra en la Figura 8a. Las interacciones hidrofóbicas se presentaron entre el anillo de benceno del extremo superior del flavonoide y la Pro416, evento que favorece aún más la estabilidad del complejo, tanto a nivel estructural como energético. Todo lo anterior puede dar explicación a la alta actividad inhibitoria de esta molécula.

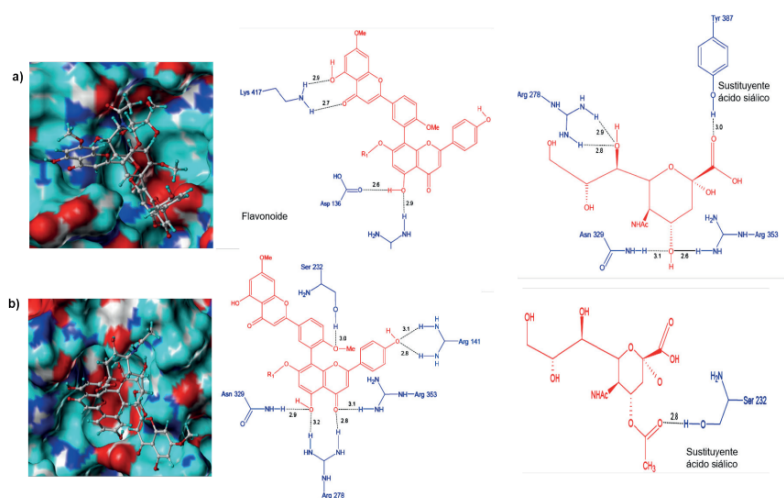


FIGURA 8
 Conformación de los ligandos e interacciones entre el sitio activo de la neuraminidasa H1N1 y a) 5R y b) 5S.

Por su parte, el complejo 5S-H1N1 mostró que el ligando adoptó una conformación similar a la de 5R dentro de sitio activo de la proteína (Figura 8b). La parte biflavonoide formó cinco puentes de hidrógeno, siendo dos de ellos con residuos del sitio activo (Arg278 y Arg353), mientras que el sustituyente ácido siálico acetilado solo tuvo un contacto (Figura 8b). Los contactos hidrofóbicos se establecieron con los residuos Pro231, Lys135, Ile208, y Asp136, resaltando que los dos últimos pertenecen al sitio activo de la proteína. Por tanto, esta información deja en evidencia que la actividad inhibitoria de los ligandos 5R y 5S está relacionada con su capacidad de acople al sitio activo y el tamaño de sus sustituyentes.

Complejos neuraminidasa H1N1-65R y H1N1-6S

El complejo H1N1-6R se muestra en la Figura 9a. Al igual que los ligandos de la serie cinco, 6R se ubicó de forma favorable dentro del sitio activo gracias a la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Es así como la parte flavonoide de 6R formó tres puentes de hidrógeno con los residuos Arg103 (sitio activo) y Thr423, como se observa en la Figura 9a. Por su parte, el sustituyente ácido siálico formó seis puentes de hidrógeno con cinco residuos, siendo cuatro de ellos del sitio activo (Arg103, Arg353, Arg278, Tyr387) y la Glu263 (figura 9a).

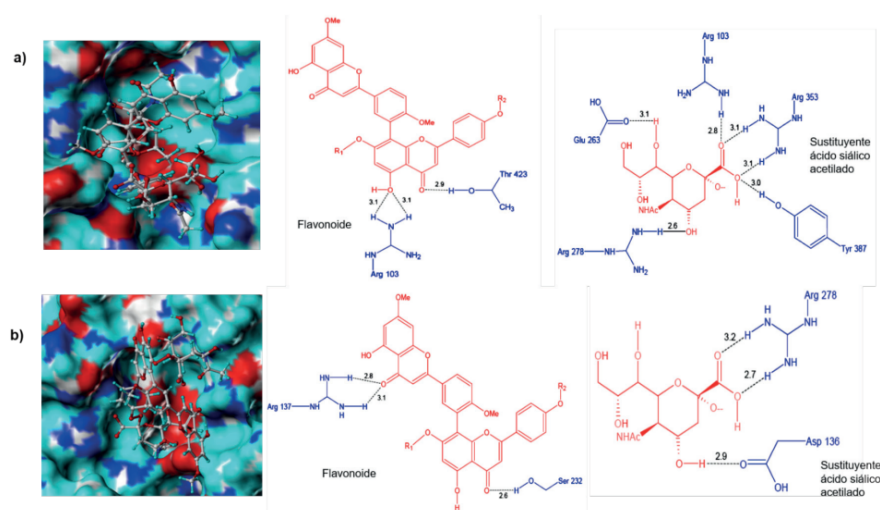


FIGURA 9

Conformación de los ligandos e interacciones entre el sitio activo de la neuraminidasa H1N1 y a) 6R y b) 6S.

En general 6R estableció nueve puentes de hidrógeno, de los cuales cuatro pertenecen al sitio activo, en el que se destacan los formados con Arg353 y Arg103. Los contactos hidrofóbicos más importantes se formaron con Pro416, Thr423 y Asp136. La Pro416 interactúa con el radical metilo y todo el anillo de benceno superior del biflavonoide, mientras que Thr423 lo hace con los dos anillos de benceno adyacentes al biflavonoide (3' → 8"). Por otro lado, el complejo H1N1-6S al igual que H1N1-6R mostró ser energéticamente favorable (Figura 9b). La parte biflavonoide formó tres puentes de hidrógeno, uno con Ser232 y dos con Arg137 (sitio activo). En lo que respecta al ácido siálico, se observó la formación de tres puentes de hidrógeno dos con Arg278 y uno con Asp136; ambos residuos hacen parte del sitio activo de H1N1.

Con base en la información descrita, se pudo establecer que la actividad inhibitoria de los ligandos con H1N1 está mediada por la formación de interacciones tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas, es así como se encontró que 3S tiene pocas interacciones, hecho consecuente con baja actividad inhibitoria ($IC_{50} > 100$), mientras que el ligando 5R ($IC_{50} = 5,50$), con la actividad más alta mostró un mayor número de interacciones. También, el acople de los ligandos al sitio activo de la proteína indicó que estos actúan como inhibidores competitivos y que la estereoquímica R del C2 en el sustituyente ácido siálico favorece a una mejor interacción con la proteína, debido a su menor volumen y la presencia de los grupos hidrofílicos OH.

Acoplamiento molecular complejo ligandos-neuraminidasa H5N1

Complejos neuraminidasa H5N1-F36 y H5N1-Ginkgetin

El complejo F36-H5N1 muestra que el ligando F36 se acopla de manera favorable al sitio activo de la proteína a través de la formación de puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos (figura 10a). Los siete puentes de hidrógeno se presentaron con cinco residuos de aminoácidos, de los cuales solo la Tyr347 no pertenece al sitio activo, como se observa en la figura 10a. Los residuos Arg118 y Arg371 con sus grupos NH_2 de las cadenas laterales interactúan fuertemente formando cuatro enlaces con OH de C5 y OCH_3 de C8 respectivamente, mientras que el residuo Tyr347 forma un enlace con O1 del anillo de pirona. El OH de Tyr406 y el carbonilo de Asp151 hacen lo propio con los sustituyentes OH de C4' y C5, respectivamente. Los contactos hidrofóbicos presentes en este complejo los constituyen las partes apolares de los aminoácidos citados con los anillos aromáticos del ligando. Un análisis comparativo entre los complejos del ligando F36 con las neuraminidasas H1N1 y H5N1 muestra una tendencia a conservar las interacciones por puentes de hidrógeno en su mayoría con residuos del sitio activo, siendo los puntos críticos el sustituyente OH de C4',

el radical OCH₃ de C8 y el O del anillo de pirona, así como los anillos de benceno que participan en los contactos hidrofóbicos.

Para el caso de Ginkgetin (figura 10b), el complejo evidenció que solo la parte flavonoide interactúa con el sitio activo de la proteína, comportamiento que es similar al observado con H1N1. En general, la Ginkgetin formó cinco puentes de hidrógeno con cuatro aminoácidos, de los cuales dos corresponden al sitio catalítico (Arg118 y Arg371) (figura 10b). La Arg118 se enlaza fuertemente con sus NH₂ formando dos enlaces con el carbonilo de C4' del anillo de pirona, al igual que Lys432 que se une al otro anillo de pirona con el oxígeno carbonilo de C4. Los sustituyentes OH de C7' y C4'' forman puentes de hidrógeno respectivamente con Arg371 y Ser246. Los puntos críticos de estabilización de Ginkgetin tanto en H1N1 y H5N1 corresponden a los grupos OH de C4'' y C7', así como el oxígeno carbonilo de C4. Además, el complejo con H5N1 se estabiliza más por contactos hidrofóbicos que el correspondiente complejo con H1N1 (figuras 11a y 11b). No obstante, los complejos formados por Ginkgetin en ambos casos son inestables, hecho que desfavorece su actividad inhibitoria.

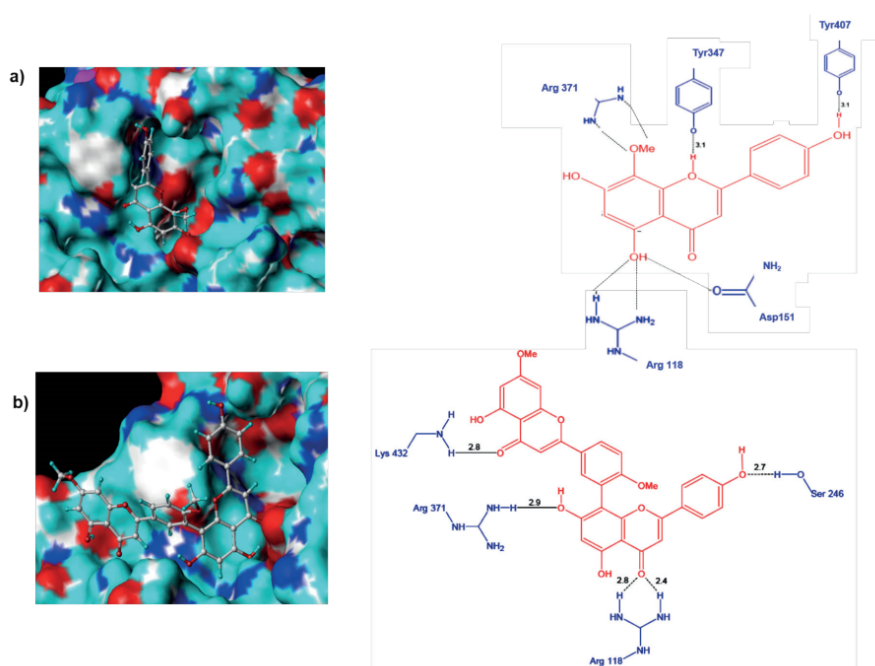


FIGURA 10

Conformación de los ligandos e interacciones entre el sitio activo de la neuraminidasa H5N1 y a) F36 y b) Ginkgetin.

Complejos neuraminidasa H5N1-5R y H5N1-6R

El complejo formado por 5R al igual que su homólogo H1N1 se acopló energéticamente favorable con el sitio activo (Figura 11a). La parte del biflavonoide de 5R formó puentes de hidrógeno con los residuos Lys432, Tyr347 y Ser246, los cuales no pertenecen al sitio activo de la proteína, sin embargo, Lys432 y Ser246 toma relevancia puesto que participaron en la estabilización de los complejos formados con F36 y Ginkgetin. La parte del ácido siálico desempeña un papel importante en el acople de la molécula, debido a que ella interactúa de forma mayoritaria con el sitio activo de H5N1. Es así como siete puentes de hidrógeno se establecieron con los residuos Arg118, Arg292, Arg371 (Sitio activo) y Tyr347. Las Arg371 y Arg292 con sus grupos NH₂ ataca al grupo carboxilo en C1, por tanto, este radical se convierte en un punto crítico del ligando, mientras que Arg118 forma dos puentes de hidrógeno con los grupos OH en C4 y C6, respectivamente, y Tyr347 con el radical OH en C9. En cuanto a los contactos hidrofóbicos se encontró que

el residuo Pro431 interacciona fuertemente con la cadena carbonada del extremo del ácido siálico y el anillo de la Tyr347 con el metilo del grupo OCH₃ ubicado en C7.

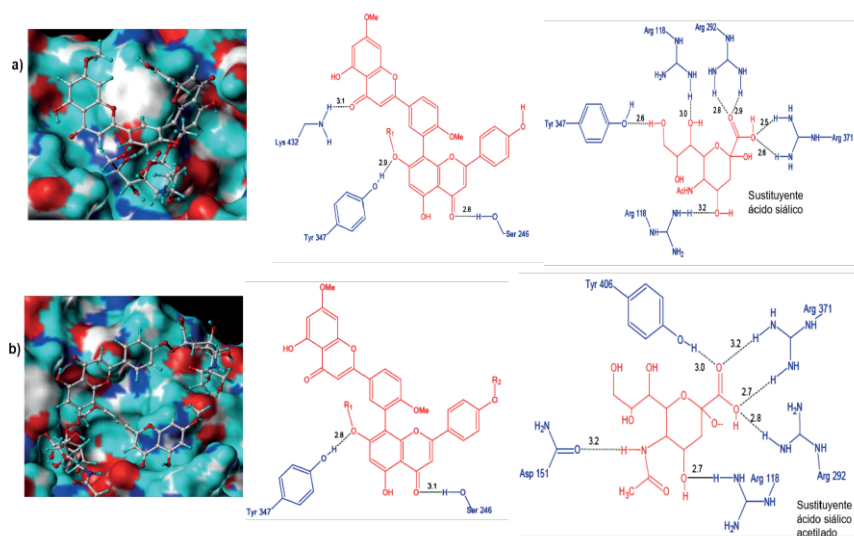


FIGURA 11
Conformación de los ligandos e interacciones entre el sitio activo de la neuraminidasa H1N1 y a) 5R y b) 6R.

Por otro lado, el ligando 6R a diferencia de 5R se acomoda en el sitio activo de H5N1 a través del sustituyente de ácido siálico de la posición R1 y una pequeña porción del biflavonoide (figura 11b). El análisis de interacciones mostró que el sustituyente ácido siálico de R1 estableció seis puentes de hidrógeno con la cavidad (Tyr406, Arg371, Arg292, Arg118, Asp151), mientras que dos con la parte flavonoide (Tyr347 y Ser246). Los contactos hidrofóbicos fueron mediados por la cadena apolar del ácido siálico y Asp198, Ile222 y Asn221. La suma de las interacciones evidencia la estabilidad del complejo mostrado en la figura 11b.

Conclusiones

Este estudio permitió obtener la estructura tridimensional de la neuraminidasa H1N1 mediante el modelado por homología, usando como plantilla la proteína H5N1 disponible en el Protein Data Bank (2HTY). De acuerdo con los parámetros evaluados, este modelo mostró ser geométrica y energéticamente estable, convirtiéndose en material disponible para ensayos *in silico* que requieran de esta estructura. El análisis del acoplamiento molecular permitió evidenciar la relación entre el poder inhibitorio de los análogos de flavonoides derivados de amentoflavona y las interacciones establecidas con el sitio activo de las neuraminidasas H1N1 y H5N1 del virus de la gripa aviar. Es así como los ligandos 5R y 6R con las mejores actividades inhibitorias contra H1N1 mostraron tener un mayor número de interacciones del tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas con el sitio activo de ambas proteínas. Además, se resalta el papel de la estereoquímica R sobre la S, debido a que la primera ofrece más flexibilidad al ligando y, por ende, brinda el espacio para formar un número mayor de interacciones. Por otro lado, los ligandos 5R y 6R acoplados con H1N1 mostraron que la actividad inhibitoria mejora cuando el grupo en R1 tiene poco volumen (5R), ya que las interacciones se distribuyen de forma similar entre la parte biflavonoide y el sustituyente de R1, lo cual confiere una mayor estabilidad al complejo. Por tanto, este trabajo propone la evaluación experimental de los ligandos 5R y 6R como potenciales inhibidores de H5N1 y posterior uso en ensayos clínicos.

REFERENCIAS

- [1] J. Olivero-Verbel, I. Lans, E. Martínez, I. Ospino, A. Padilla y R. Vivas-Reyes, "Molecular design of inhibitors against the Mproprotein of the severe acute respiratory syndrome (SARS) virus," *New J. Chem.*, vol. 32, no. 3, pp. 452-458, 2008, doi: 10.1039/B704880G.
- [2] R. Vivas-Reyes, J. Ruiz y R. Caraballo, "Estudio teórico del virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) a través del uso de métodos de acoplamiento molecular," *Rev. Colomb. Quím.*, vol. 38, no 3, p. 327-339, 2009.
- [3] A. G. Harrison, T. Lin y P. Wang, "Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis," *Trends Immunol.*, vol. 41, no. 12, pp. 1100-1115, 2020, doi: 10.1016/j.it.2020.10.004.
- [4] P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder y V. Thiel, "Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 3, pp. 155-170, 2021, doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
- [5] N. Kirtipal, S. Bharadwaj y S. G. Kang, "From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 85, p. 104502, 2020, doi: 10.1016/J.MEEGID.2020.104502.
- [6] D. J. Alexander, "An overview of the epidemiology of avian influenza," *Vaccine*, vol. 25, no. 30, pp. 5637-5644, 2007, doi: 10.1016/J.VACCINE.2006.10.051.
- [7] A. J. W. te Velthuis y E. Fodor, "Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, no. 8, pp. 479-493, 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2016.87.
- [8] D. J. Alexander, "Avian influenza viruses and human health," *Dev. Biol. (Basel)*, vol. 124, pp. 77-84, 2006.
- [9] W. Chen et al., "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death," *Nat. Med.*, vol. 7, no. 12, pp. 1306-1312, 2001, doi: 10.1038/nm1201-1306.
- [10] J. J. Skehel y D. C. Wiley, "Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 69, no. 1, pp. 531-569, 2000, doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
- [11] L. H. Pinto, L. J. Holsinger y R. A. Lamb, "Influenza virus M2 protein has ion channel activity," *Cell*, vol. 69, no. 3, pp. 517-528, 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90452-I.
- [12] G. Neumann, G. G. Brownlee, E. Fodor y Y. Kawaoka, "Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation," in *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 283, Germany, 2004, pp. 121-143.
- [13] S. J. Gamblin, "The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin," *Science* (80), vol. 303, no. 5665, pp. 1838-1842, 2004, doi: 10.1126/science.1093155.
- [14] B. Winkel-Shirley, "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology," *Plant Physiol.*, vol. 126, no. 2, pp. 485-493, 2001, doi: 10.1104/pp.126.2.485.
- [15] F. X. Bosch, M. Orlich, H. D. Klenk y R. Rott, "The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses," *Virology*, vol. 95, no. 1, pp. 197-207, 1979, doi: 10.1016/0042-6822(79)90414-8.
- [16] C. A. Williams y R. J. Grayer, "Anthocyanins and other flavonoids," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 21, no. 4, p. 539, 2004, doi: 10.1039/b311404j.
- [17] B. A. Graf, P. E. Milbury y J. B. Blumberg, "Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological Evidence," *J. Med. Food*, vol. 8, no. 3, pp. 281-290, 2005, doi: 10.1089/jmf.2005.8.281.
- [18] K. Miki et al., "Anti-influenza virus activity of biflavonoids," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 3, pp. 772-775, 2007, doi: 10.1016/j.bmcl.2006.10.075.
- [19] M. Ahumado, J. Galindo, J. Vergara, J. Alí-Torres y R. Vivas-Reyes, "The role of LasR active site amino acids in the interaction with the Acyl Homoserine Lactones (AHLs) analogues: A computational study," *J. Mol. Graph. Model.*, 86, 2019, 113-124
- [20] M. Ahumado, J. C. Drosos y R. Vivas-Reyes, "Application of molecular docking and ONIOM methods for the description of interactions between anti-quorum sensing active (AHL) analogues and the *Pseudomonas aeruginosa* LasR," *Mol. Biosyst.* vol. 10, pp. 1162-1171, 2014.

- [21] C. Gueto, J. Torres y R. Vivas-Reyes, "CoMFA, LeapFrog and blind docking studies on sulfonanilide derivatives acting as selective aromatase expression regulators," *Eur. J. Med. Chem.* vol. 44, no. 9, pp. 3445-3451, 2008.
- [22] J. Ali-Torres y J. J. Dannenberg, "The Folding of Acetyl(Ala)28NH2 and Acetyl(Ala)40NH2 Extended Strand Peptides into Antiparallel β -Sheets. A Density Functional Theory Study of β -Sheets with β -Turns," *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 48, pp. 14017-14022, 2012
- [23] H. M. Berman, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 235-242, 2000, doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- [24] R. J. Russell et al., "The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design," *Nature*, vol. 443, no. 7107, pp. 45-49, Sep. 2006, doi: 10.1038/nature05114.
- [25] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman, "Basic local alignment search tool," *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403-410, Oct. 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [26] Protein BLAST: Search protein databases using a protein query [Online]. Nih.gov. [cited 2021 Jul 15]. Available: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- [27] Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW [Online]. Genome.jp. [cited 2021 Jul 15]. Available: <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>.
- [28] V. A. Simossis y J. Heringa, Optimally segmented consensus secondary structure prediction, 2004. [Online]. Available: <http://zeus.cs.vu.nl/programs/sympredwww/>.
- [29] G. Winter y S. Fields, "Nucleotide sequence of human influenza A/PR/8/34 segment 2," *Nucleic Acids Res.*, vol. 10, no. 6, pp. 2135-2143, 1982, doi: 10.1093/nar/10.6.2135.