

Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas
Centro de Investigación en Dinámica Celular

**“Proteína de unión a DNA (DBP) de Adenovirus Humano
Tipo 5 (HAdV-5) como blanco biológico en el diseño de
antivirales contra adenovirus”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

PRESENTA:

ÓSCAR ADRIÁN RODRÍGUEZ VARGAS

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ramón Antonio González García Conde

Agradecimientos

“El pájaro rompe el cascarón. El cascarón es el mundo. El que quiere nacer tiene que romper un mundo” (En *Demian*, de Hermann Hesse).

A los miembros de mi comité tutorial, la doctora Nina Pastor y los doctores Carlos Amero, César Millán y Jesús Bahena, por su tiempo, consejos y correcciones; por guiar mis primeros pasos a través de la academia, por su paciencia con mi ignorancia y sus mejores deseos en el porvenir de este proyecto.

A los doctores Ramón González y *alguien más*, por sus enseñanzas a lo largo de toda mi formación académica, les agradezco con un poema:

“¿Acaso son ustedes Virgilio, aquella fuente de la que brota un río de elocuencia? Ustedes, honor y luz de los científicos en ciernes, válganme el gran amor y el largo estudio con el que he examinado su volumen. Ustedes son mis maestros, son mis autores, los únicos de quienes he asimilado el estilo que me honra” (Fragmento modificado de la traducción de José María Micó, del Canto I de *La Comedia*, de Dante Alighieri).

Al doctor Ramón González, en particular, quisiera también agradecerle por aquellas veces en que compartimos una canción, un poema o una reflexión; por confiar en mí y ceder ante un par de mis necesidades.

A mi madre, una mujer dulcísima y excepcional, por mostrarme lo grande que uno puede llegar a ser a pesar de las adversidades y enseñarme que a través de no más que el intelecto y el amor uno puede arrebatarse al mundo todo lo que alguna vez le quitó. Porque gracias a ella no tuve que volver a trabajar al mismo tiempo en que estudiaba, porque me ha dado una vida privilegiada, porque jamás me ha dado la espalda y porque si es cierto que ella existe, entonces también vale la pena que yo lo intente.

A mis hermanas Sofía y Wendy, por su delicadeza y el amor que siempre me han brindado cuando el mundo se me ha caído a pedazos. A la más pequeña de mis hermanas, Nicole, de quien a veces puedo escuchar por el teléfono un “te quiero”, que jamás falla en devolverme la inspiración.

A mis mejores amigos Emilio Villareal y Luis Lara, por quienes me he atrevido a vivir lo que ellos ya no podrán, porque en honor a su memoria jamás he de rendirme ante esta travesía que apenas comienza. A mis mejores amigos Pablo y Bruno, *my safe space*, porque en las noches más oscuras el calor de su amistad abriga toda dolencia, todo mi miedo y todo mi amor. A la memoria de Kiba, la dóberman con ojos de fuego, y a la compañía de Crowley, la husky atolondrada.

A mis recuerdos, un fragmento de mi memoria:

—Padre, ¿qué es el sol?

—Una estrella que se conflagra, inmensa,
como mi corazón cuando le sonrías.

—Si tienes un sol por corazón, padre,
entonces... ¿qué tengo yo?

—Otra estrella, querido.

—Pero... ¿cuál?

—La más bella, Adrián, la más bella...

Un último fragmento, a la vida:

“El sufrimiento —por curioso que esto pueda parecer— es el medio por el que existimos y es el único medio por el que somos conscientes de existir, y el recuerdo del sufrimiento en el pasado nos es necesario como garantía, evidencia, de nuestra identidad continuada” (En De profundis, de Oscar Wilde).

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología Molecular del CIDC-IICBA UAEM, bajo la dirección del Dr. Ramón A. González y contó con el apoyo del proyecto A1-S-8696 del CONACyT.

Índice

Agradecimientos	2
Resumen.....	7
Abreviaturas	8
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tablas	13
I. Introducción	14
1.1 Clasificación de Adenovirus	14
1.2 Patogénesis	14
1.2.1 Infecciones en el tracto respiratorio (RTIs).....	14
1.2.2 Infecciones en el tracto gastrointestinal (GI)	15
1.2.3 Infecciones Oculares	15
1.2.4 Infecciones en el tracto urinario (UTIs)	16
1.2.5 Otras manifestaciones	16
1.3 Epidemiología	17
1.4 Genoma de Adenovirus	18
1.5 Estructura del virión	19
1.6 Ciclo de Infección	20
1.7 Replicación del DNA de Adenovirus.....	22
1.8 Proteína de unión a DNA (DBP).....	24
1.8.1 Interacciones hidrofóbicas del brazo C-terminal	28
1.8.2 Interacciones por enlace de hidrógeno del brazo C-terminal	29
1.8.3 Implicaciones del brazo C-terminal	29
1.9 Terapias Actuales contra adenovirus.....	34
1.9.1 Análogos de nucleótidos y nucleósidos	35

1.9.2	Inhibidores de HDAC y proteínas reguladoras epigenéticas	35
1.9.3	Compuestos basados en esteroides.....	36
1.9.4	Alternativas	36
1.10	Inhibidores de interacción proteína-proteína (PPIIs).....	36
II.	Hipótesis.....	38
2.1	Justificación.....	38
2.2	Objetivo general	38
2.3	Objetivos particulares.....	38
III.	Materiales y Métodos.....	40
3.1	Análisis de las Interacciones	40
3.2	Análisis del estado de conservación	41
3.3	Acoplamiento Molecular y Alanine Scanning.....	42
3.4	Modelo Farmacofórico y Cribado Molecular	43
IV.	Resultados.....	44
4.1	Análisis de las Interacciones.....	44
4.1.1	Interacciones hidrofóbicas resueltas por LigPlot+.....	44
4.1.2	Interacciones por enlace de hidrógeno resueltas por LigPlot+	46
4.1.3	Interacciones resueltas por Discovery Studio.....	47
4.2	Análisis del estado de conservación	50
4.3	Acoplamiento molecular de los residuos 525-529 del brazo C-terminal por AutoDock-VINA.....	53
4.3.1	Acoplamiento de los residuos 525-529.....	55
4.4	Alanine Scanning de los residuos 525-529 por AutoDock-Vina.....	67
4.4.1	N525A.....	67
4.4.2	P526A	70

4.4.3 F527A	72
4.4.4 D528A.....	73
4.4.5 F529A	76
4.5 Modelo farmacofórico de los residuos 525-529 del brazo C-terminal	77
4.5.1 Características del acoplamiento de los compuestos con mayor energía de afinidad	82
4.5.2 Características de los acoplamientos de menor energía de afinidad.....	89
4.5.3 Propiedades de los compuestos con mayor energía de afinidad	91
V. Discusión de Resultados	96
VI. Conclusiones	98
6.1 Perspectivas.....	99
VII. Referencias.....	99

Resumen

Los adenovirus (AdV) son un grupo de virus icosaédricos sin envoltura, con genoma de DNA lineal de doble cadena (dsDNA), que pertenecen al género *Mastadenovirus* y a la familia *Adenoviridae*. Su tamaño oscila entre los 90 a 100nm y su genoma entre 26-45kb, el cual codifica para ~40 proteínas. Los adenovirus humanos (HAdV) comprenden 7 especies (A-G) y por lo menos 113 tipos distintos, siendo los serotipos C2 y C5 los más estudiados y mejor caracterizados. Estos virus se propagan principalmente a través de aerosoles, especialmente en lugares de hacinamiento, y suelen causar enfermedades respiratorias, oculares, gastrointestinales o urinarias; el tipo de enfermedad causada y su severidad dependen del tipo de AdV. Debido a su dispersión en el mundo se consideran patógenos ubicuos, aunque no suelen afectar gravemente a pacientes inmunocompetentes; sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en niños y recién nacidos, la enfermedad es en general severa y puede causar la muerte. Actualmente no existe tratamiento o terapia aprobada específica para adenovirus, por lo que el diseño de nuevos fármacos es prioridad. Existe una vacuna bastante segura y efectiva, pero ésta no se encuentra disponible para el público y los fármacos que se suelen utilizar, principalmente análogos de nucleótidos y nucleósidos como el cidofovir, no han mostrado ser suficientemente efectivos. En este estudio, se propone el diseño de inhibidores de interacción proteína-proteína (PPIIs) con base en las actividades que desempeña la proteína de unión a DNA (DBP) de adenovirus. La actividad de esta proteína es crucial durante el proceso de replicación del DNA de adenovirus debido a que, entre otras funciones, DBP desestabiliza a la hebra de dsDNA en la horquilla de replicación y también protege y estabiliza a la hebra de ssDNA durante la elongación del templado; estas funciones están asociadas con la capacidad de DBP de multimerizarse. Inhibir la multimerización de DBP, inhibe la replicación del DNA de AdV. Por tanto, diseñar un PPII que actúe como antagonista ortostérico de la multimerización, debería ser suficiente para inhibir la replicación del DNA de adenovirus. La multimerización depende completamente de una secuencia de 17-18 residuos denominada brazo C-terminal, por lo que se llevó a cabo un análisis de las interacciones que se establecen en la interfaz entre el brazo y un monómero de DBP adyacente, un análisis del estado de conservación de los residuos del brazo y de los residuos con los que interactúa en la interfaz, y un análisis de acoplamiento molecular sobre los residuos 525-529, los cuales se anclan en una depresión hidrofóbica determinante en la multimerización. Con base en los resultados obtenidos se diseñó un modelo farmacofórico de los residuos 525-529, el cual nos permitió encontrar hasta doce compuestos con las características deseadas, cinco de los cuales se identificaron como posibles candidatos para evaluar su capacidad como inhibidores de la interacción entre los residuos 525-529 y la cavidad en la que interactúan. El compuesto (M11) que presenta la mayor energía de afinidad, también presenta el mejor índice como posible fármaco acorde a las propiedades computadas.

Abreviaturas

Å—Angstroms
Ad Pol—Polimerasa de Adenovirus
ADP—Proteína de Muerte de Adenovirus
AdV—Adenovirus
CAR—Receptor de Coxsackie y Adenovirus
CD46—Proteína Cofactor de Membrana
CDV—Cidofovir
CPE—Efectos Citopáticos
C-Terminal—Carboxilo Terminal
DBP—Proteína de Unión a DNA
dCTP—Desoxicitidina Trifosfato
DNA—Ácido Desoxirribonucleico
dsDNA—DNA de doble cadena
EKC—Queratoconjuntivitis Epidémica
FDA—Administración de Alimentos y Medicamentos
GI—Tracto Gastrointestinal
GST—Glutación S-Transferasa
HAdV—Adenovirus Humano
HC—Cistitis Hemorrágica
HDAC—Inhibidores de Histonas Desacetilasas
HSCT—Células Madre Hematopoyéticas
HYDE—de Enlace de Hidrógeno y Desolvatación
ITRs—Repeticiones Terminales Invertidas
K₃UO₂F₅—Fluoruro de Uranilo de Potasio
kb—kilo bases
kcal/mol—kilo calorías por mol
MLP—Promotor Principal Tardío
MLTU—Unidad de Transcripción Tardía
mRNA—RNA mensajero
NF1—Factor nuclear 1

nm—nanómetros
N-Terminal—Amino Terminal
OB—Bronquiolitis Obliterante
oct-1—Factor de Transcripción oct-1
PDB—Protein Data Bank
Pol—Polimerasa
PPIIs—Inhibidores de Interacción Proteína-Proteína
PPIs—Interacciones Proteína-Proteína
pTP—Proteína Pre-Terminal
RCs—Compartimentos de Replicación Viral
RGD—Motivo de Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
RMSD—Desviación Cuadrática Media
RNA—Ácido Ribonucleico
RTIs—Infecciones en el Tracto Respiratorio
sDNA—DNA de cadena sencilla
SR—Motivo de Serinas y Argininas
UTIs—Infecciones en el Tracto Urinario
UXP—Proteína de Exón U
VA RNA— RNA Asociado a Virus
WT—Péptido Wildtype
D528A—Sustitución de D por A en WT
F527A—Sustitución de F por A en WT
F529A—Sustitución de F por A en WT
N525A—Sustitución de N por A en WT
 Δ N-DBP—DBP sin el extremo N-terminal
 Δ N Δ C-DBP— Δ N-DBP sin el brazo C-terminal
 Δ N Δ FL-DBP— Δ N-DBP sin el loop flexible
P526A—Sustitución de P por A en WT

Índice de Figuras

Figura 1. Seroprevalencia de tipos de HAdV usados clínicamente	18
Figura 2. Genoma de Adenovirus	19
Figura 3. Estructura del virión de Adenovirus Humano	20
Figura 4. Representación del ciclo de replicación de Adenovirus	21
Figura 5. Replicación del genoma de adenovirus	23
Figura 6. Esquema de las estructuras secundarias del extremo C-terminal de DBP y modelo de un trímero de moléculas de DBP unidas mediante el brazo C-terminal	25
Figura 7. Extremo C-terminal de la proteína de unión a DNA (DBP) de Adenovirus	26
Figura 8. Aminoácidos conservados en el extremo C-terminal de DBP	27
Figura 9. Depresiones hidrofóbicas en donde el brazo C-terminal se ancla	29
Figura 10. Efecto de la región de bisagra en la orientación del brazo C-terminal	31
Figura 11. Modelo sobre la importancia de la flexibilidad en la región de bisagra del brazo C-terminal	32
Figura 12. Modelo del efecto del loop flexible y el brazo C-terminal en la desestabilización de DNA durante la elongación	33
Figura 13. Diagrama general de la metodología	40
Figura 14. Diagrama en 2D de las interacciones hidrofóbicas	45
Figura 15. Diagrama en 2D de las interacciones por enlace de hidrógeno	47
Figura 16. Diagramas en 2D de las interacciones identificadas por Discovery Studio	48
Figura 17. Alineamiento múltiple de secuencias	51
Figura 18. Forma de las cavidades hidrofóbicas en donde interactúan los residuos V513, L515, P516, P526 y F527	53
Figura 19. Diagrama de las interacciones de los residuos 525-529	54
Figura 20. Posicionamiento de los residuos en el cristal vs Acoplamiento por AutoDock-Vina	56
Figura 21. Interacciones formadas por las poses 7 y 30	57
Figura 22. Caso a-1—Cambio en la orientación de los residuos D528 y F529	58
Figura 23. Caso a-1—Pose 11	59
Figura 24. Caso b-1—Posicionamiento del grupo carboxilo de F529 fuera de la	

cavidad	60
Figura 25 Caso b—Pose 19	61
Figura 26. Caso a-2—Posicionamiento invertido (FDFPN) y cambio en la orientación de N525 y P526	62
Figura 27. Caso b-2—Posicionamiento no-invertido (NPFDF) y cambio en el posicionamiento de N525 y P526	63
Figura 28. Péptido invertido—caso a-2	64
Figura 29. Acoplamiento de mayor energía—WT	65
Figura 30. Acoplamiento de mayor energía—WT	65
Figura 31. Acoplamientos de mayor energía—N525A	68
Figura 32. Poses de mayor energía N525A vs WT	69
Figura 33. Acoplamientos de mayor energía—P526A	71
Figura 34. F529 tiende a acoplarse en la posición de F527	73
Figura 35. Acoplamientos de mayor energía—Péptido no-invertido (NPFAP)	74
Figura 36. Acoplamientos de mayor energía—Péptido invertido (FAFPN)	75
Figura 37. Acoplamiento de mayor energía—F529A	77
Figura 38. Modelos farmacofóricos.	78
Figura 39. Compuesto M2	82
Figura 40. Compuesto M2—Acoplamiento de mayor energía—ejemplo	83
Figura 41. Compuesto M5	83
Figura 42. Compuesto M5—Acoplamiento de mayor energía—ejemplo	84
Figura 43. Compuesto M6	84
Figura 44. Compuesto M6—Acoplamiento de mayor energía y cambio en la orientación del cuarto grupo	85
Figura 45. Compuesto M6—Interacciones del acoplamiento de mayor energía y efecto del cambio en la orientación del cuarto grupo	85
Figura 46. Compuesto M8	86
Figura 47. Compuesto M8—Acoplamientos de mayor energía	87
Figura 48. Compuesto M11	88
Figura 49. Compuesto M11—Acoplamientos de mayor energía—ejemplo	88

Figura 50. Compuesto M11—Efecto en la energía de afinidad cuando el grupo #2 se acopla en la posición de F527	89
Figura 51. Compuestos con heterociclos similares a M5	90
Figura 52. Propiedades del compuesto M2	91
Figura 53. Propiedades del compuesto M5	92
Figura 54. Propiedades del compuesto M6	93
Figura 55. Propiedades del compuesto M8	94
Figura 56. Propiedades del compuesto M11	95

Índice de Tablas

Tabla 1. Patología de los diferentes tipos de Adenovirus	16
Tabla 2. Estado de conservación y localización de los residuos	28
Tabla 3. Terapias actuales	34
Tabla 4. Tipos de adenovirus utilizados en el alineamiento múltiple de secuencias	41
Tabla 5. Configuración de la caja de AutoDock-Vina	43
Tabla 6. Clasificación de las interacciones proteína-proteína	44
Tabla 7. Interacciones hidrofóbicas	45
Tabla 8. Interacciones por enlace de Hidrógeno	46
Tabla 9. Tipos de interacciones formadas por los principales residuos implicados en la multimerización de DBP	50
Tabla 10. Estado de conservación de los residuos que interactúan con V513, L515, P516, P526 y F527	52
Tabla 11. Tipos de interacciones formadas por N525, D528, F529	54
Tabla 12. Estado de conservación de los residuos que interactúan con N525, D528, F529	55
Tabla 13. Energía de afinidad—Péptido WT	55
Tabla 14. Principales interacciones hidrofóbicas resueltas para las poses 7 y 30	57
Tabla 15. Interacciones de P526 y F527	59
Tabla 16. Principales interacciones hidrofóbicas	64
Tabla 17. Energía de afinidad N525A	67
Tabla 18. Energía de afinidad P526A	70
Tabla 19. Energía de afinidad F527A	72
Tabla 20. Energía de afinidad D528A	73
Tabla 21. Energía de afinidad F529A	76
Tabla 22. Moléculas seleccionadas	79

I. Introducción

1.1 Clasificación de Adenovirus

Los adenovirus humanos (HAdV) comprenden 7 especies (A-G) del género *Mastadenovirus* y por lo menos 113 tipos distintos (<http://hadv.wg.gmu.edu/>), 51 de los cuales se han clasificado como serotipos (Dhingra et al., 2019; Lynch & Kajon, 2016); el resto se han identificado y caracterizado con base en su genoma (Seto et al., 2011). Aproximadamente un tercio de estos serotipos están asociados con enfermedades humanas (Lynch & Kajon, 2016); siendo los serotipos C2 y C5 los más estudiados y mejor caracterizados bio-molecularmente (Charman et al., 2019; Saha & Parks, 2020). No obstante, tanto la especie C como las especies A, B, D, E y F, han estado implicadas en brotes de infección por todo el mundo (Lynch & Kajon, 2016).

1.2 Patogénesis

Los adenovirus (AdV) se propagan principalmente a través de aerosoles, especialmente en lugares de hacinamiento como cuarteles, escuelas y hospitales, pero también por la ruta fecal-oral, inoculación conjuntival o por exposición a tejido o sangre infectada (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Saha & Parks, 2020). El periodo de incubación depende del serotipo y el mecanismo de transmisión, pero en general abarca entre dos días y dos semanas (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016). En pacientes inmunocompetentes, la liberación de progenie viral ocurre durante aproximadamente 1-3 días desde la garganta de adultos con resfriado común; 3-5 días desde la nariz, garganta, heces u ojos en pacientes con fiebre faringoconjuntival; 2 semanas a partir de cultivos oculares de queratoconjuntivitis; y 3 a 6 semanas a partir de la garganta o heces de niños con enfermedad generalizada o respiratoria; en pacientes inmunocomprometidos, por otro lado, no hay información detallada, pero la liberación de progenie es generalmente prolongada (Ison & Hayden, 2016). Adicionalmente, aunque la mayoría de las epidemias suceden durante el invierno o inicios de primavera, éstas ocurren a lo largo de todo el año sin estacionalidad aparente (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016).

Por otro lado, el aumento de las prácticas de trasplante acompañadas de terapias inmunosupresoras fuertes ha resultado en un aumento gradual en la incidencia de infecciones severas por adenovirus (Naesens et al., 2005). En receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) la incidencia varía entre el 3—47%; mientras que en receptores de trasplante de órganos sólidos (trasplantes de corazón, pulmón, hígado, intestinales y renales), la incidencia es del 5—22% (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016).

1.2.1 Infecciones en el tracto respiratorio (RTIs)

Los AdV suelen causar enfermedades respiratorias, oculares, gastrointestinales y urinarias ([Tabla 1](#)) (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Saha & Parks, 2020); sin embargo, el tipo de enfermedad causada y la severidad de ésta, dependen del tipo de AdV (Lynch & Kajon, 2016; Mennechet et al., 2019; Saha & Parks, 2020). Las especies B, C y E se han asociado principalmente a infecciones en el tracto respiratorio superior; los HAdV-C (en particular los tipos 1, 2 y 5) suelen

causar infecciones leves en niños pequeños, mientras que las especies B (tipos 3, 7, 14 y 21) y E (tipo 4) son más propensas a causar infecciones severas tanto en niños como adultos (Lynch & Kajon, 2016; Mennechet et al., 2019; Saha & Parks, 2020). Aproximadamente, entre el 5-10% de las infecciones pediátricas en el tracto respiratorio (RTIs) son causadas por AdV, mientras que en adultos representan el 1-7% (Lynch & Kajon, 2016). Los síntomas típicos incluyen fiebre, faringitis, amigdalitis, tos y dolor de garganta, pero también pueden presentarse síntomas del tracto gastrointestinal, especialmente en niños (Lynch & Kajon, 2016).

En pacientes inmunocompetentes, los síntomas suelen disminuir en dos semanas y la infección induce inmunidad específica; no es común que adultos inmunocompetentes presenten neumonía, pero se han reportado casos tanto en adultos como en niños previamente sanos (Lynch & Kajon, 2016). Por otro lado, en pacientes inmunocomprometidos, la diseminación o insuficiencia respiratoria severa se presenta en el 10-30% de los casos, con una tasa de muerte mayor al 50% en los casos de neumonía severa (Lynch & Kajon, 2016). En recién nacidos e infantes, la infección causa neumonía en hasta el 20% de los casos (Lynch & Kajon, 2016). En niños, las secuelas incluyen bronquiectasia, bronquiolitis obliterante (OB) y pulmón hiperlucente (Lynch & Kajon, 2016). Además, las infecciones por AdV suelen establecer infecciones latentes tanto en el tracto respiratorio superior como en el inferior, las cuales pueden durar meses o incluso años (Charman et al., 2019; Dhingra et al., 2019; Lynch & Kajon, 2016); en niños, estas infecciones persistentes pueden provocar inflamación neutrofílica crónica, bronquitis bacteriana prolongada y bronquiectasia (Lynch & Kajon, 2016).

1.2.2 Infecciones en el tracto gastrointestinal (GI)

Las especies A, D, G y particularmente la F (tipos 40 y 41), son responsables de las infecciones en el tracto GI (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Saha & Parks, 2020); los principales síntomas incluyen gastroenteritis y diarrea, aunque se han descrito casos de colitis hemorrágica, hepatitis, colecistitis y pancreatitis (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016). Se ha reportado que entre el 10-23% de los casos de niños hospitalizados por gastroenteritis aguda son causados por infecciones de AdV (Mennechet et al., 2019). Especialmente en países de ingreso bajo y medio, los AdV asociados con el tracto GI son uno de los principales agentes de enfermedad en niños menores de 5 años (Saha & Parks, 2020).

1.2.3 Infecciones Oculares

Por otro lado, la especie D se ha asociado principalmente con infecciones oculares (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Saha & Parks, 2020); éstas incluyen queratoconjuntivitis epidémica (EKC), fiebre faringoconjuntival y conjuntivitis no-específica (Lynch & Kajon, 2016). Los principales serotipos asociados con la EKC son los HAdV-D8, -19 y -37, aunque varios otros también pueden causar conjuntivitis (e.g. HAdV-B -3, -7, -11, -14 y HAdV-E -4) (Lynch & Kajon, 2016).

1.2.4 Infecciones en el tracto urinario (UTIs)

Las infecciones en el tracto urinario (UTIs) suelen manifestarse como disuria, hematuria, cistitis hemorrágica (HC) o disfunción del injerto renal (Lynch & Kajon, 2016). Los principales serotipos asociados con cistitis hemorrágica son HAdVB-11, -34, -35, -3 y -7 (Lynch & Kajon, 2016).

1.2.5 Otras manifestaciones

Algunas manifestaciones poco comunes incluyen encefalitis, meningitis, miocarditis, cardiopatía, síndromes similares a la mononucleosis, displasia pulmonar, intususcepción intestinal en niños y muerte súbita infantil (Lynch & Kajon, 2016).

Tabla 1

Patología de los diferentes tipos de Adenovirus

Sitio de Infección	Síntomas y Enfermedad	Principales Especies Asociadas	Principales Serotipos Asociados	Referencias
Tracto Respiratorio	amigdalitis, bronquiectasia, bronquiolitis obliterante, bronquitis bacteriana prolongada, dolor de garganta, faringitis, fiebre, inflamación neutrofilica crónica, insuficiencia respiratoria severa, neumonía, pulmón hiperlucente y tos.	B, C, E	B3, B7, B14, B21, C1, C2, C5	Ison & Hayden, 2016 Lynch & Kajon, 2016; Mennechet et. al, 2019 Saha & Parks, 2020
Tracto Gastrointestinal	colecistitis, colitis hemorrágica, diarrea, gastroenteritis, hepatitis y pancreatitis	A, D, F, G	F40, F41	Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Saha & Parks, 2020
Oculares	conjuntivitis no-específica, fiebre faringoconjuntival y queratoconjuntivitis epidémica	B, D, E	D8, D19, D37	Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Saha & Parks, 2020
Tracto Urinario	cistitis hemorrágica, disfunción del injerto renal, disuria y hematuria	B	B11, B34, B35, B3, B7	Ison & Hayden, 2016 Lynch & Kajon, 2016
Otras Manifestaciones	cardiopatía, displasia pulmonar, encefalitis, intususcepción intestinal infantil, meningitis, miocarditis, muerte súbita infantil y síndromes similares a la mononucleosis	No aplica	No aplica	Lynch & Kajon, 2016

1.3 Epidemiología

La dinámica de la seroprevalencia de HAdV es particularmente importante, ya que el tipo de HAdV que predomina en una región puede cambiar a lo largo del tiempo y es bastante frecuente la transmisión de nuevas cepas entre continentes (Lynch & Kajon, 2016; Mennechet et al., 2019). Su dispersión global es tal, que se consideran patógenos ubicuos ([Figura 1](#)); no obstante, existe poca información detallada sobre los estados de seroprevalencia en varias regiones y países, especialmente sobre países en desarrollo, como México (Mennechet et al., 2019). El aumento en la urbanización y globalización de países en desarrollo con malas condiciones sanitarias, en combinación con la insuficiencia de recursos para controlar brotes de infección, puede aumentar la generación de nuevos tipos de HAdV y brotes epidémicos más frecuentes (Mennechet et al., 2019).

Sobre la especie C de HAdV, se ha reportado que el tipo -C5 es el mayormente disperso (endémico), aunque con una menor proporción de casos seropositivos en Norteamérica (Estados Unidos y Canadá) en comparación con Europa, Asia y África (Mennechet et al., 2019). La seroprevalencia del tipo -C2 es entre 36-92% y \geq HAdV-C5, dependiendo de la región. El tipo -C6 presenta una seroprevalencia fluctuante entre los países en que ha sido analizado (mínima o muy alta) (Mennechet et al., 2019). Respecto a las especies D, el tipo -D26 y en menor grado los tipos -D48 y -D28, son más frecuentes en África que en otros continentes (Mennechet et al., 2019). La seroprevalencia de las especies B (tipos -B7, B-11 y -B35) es baja, aunque un poco mayor en África en comparación con el resto del mundo (Mennechet et al., 2019). Sobre las especies E y F, el tipo -E4 presenta una seroprevalencia del 17-46% en E. U. y Europa, mientras que el tipo -F41 muestra una alta seroprevalencia en todo el mundo (Mennechet et al., 2019). En resumen, algunos tipos son claramente endémicos (C2, C5, F40 y F41), mientras que otros (B35, B11, D26, D48, D56 y D58), aunque globalmente menos frecuentes, son altamente fluctuantes (Mennechet et al., 2019). Aun así, estos reportes sobre seroprevalencia se encuentran bastante sesgados en países diversos respecto a su clima y población (e.g. E.U., China y Brasil), en donde los datos reflejan pobremente la diversidad real de HAdV (Mennechet et al., 2019). La información respecto a México, Centroamérica y Sudamérica es prácticamente nula en comparación con las demás regiones mencionadas, por lo que es de vital importancia implementar campañas que permitan recabar esta información. Recientemente, en el grupo del laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigación en Dinámica Celular, se ha estudiado por primera vez la seroprevalencia en población adulta de todos los estados de la República Mexicana, encontrando índices del 80-95% para los HAdV de especies B, C y F, y superiores al 40% para especies D y E (manuscrito en preparación).

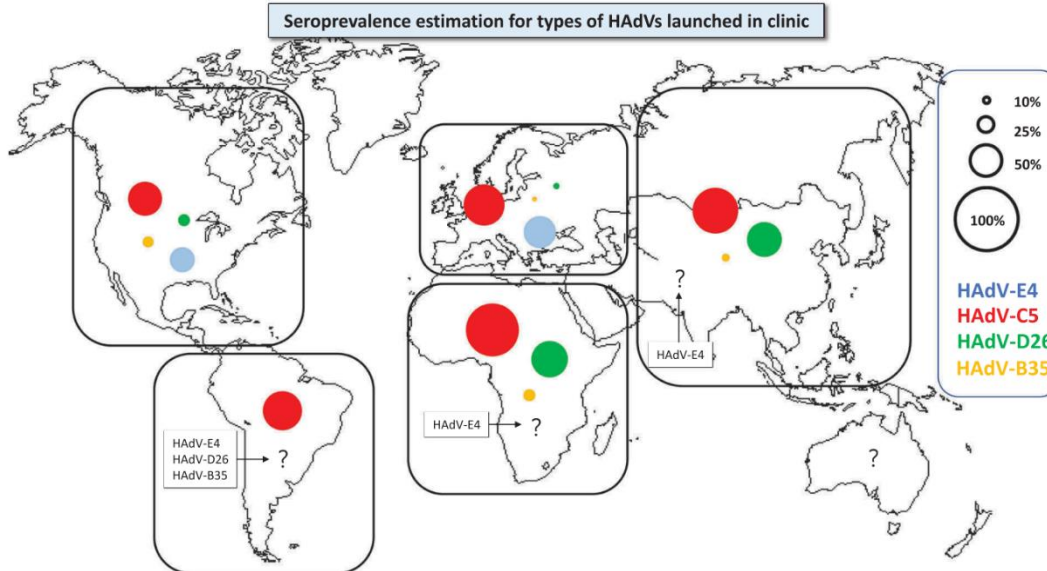


Figura 1. Seroprevalencia de tipos de HAdV usados clínicamente. La información se calculó con base en los resultados de ~30 estudios realizados durante los años ~1998-2018. Se estima la serología de HAdVs tipo -E4, -C5, -D26 y -B35, por continente. Reproducida de Seroprevalence for adenovirus types used in clinic, de Mennechet et al, 2019. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1588113>

1.4 Genoma de Adenovirus

Los adenovirus son un grupo de virus icosaédricos sin envoltura, con genoma de DNA lineal de doble cadena (dsDNA), que pertenecen a la familia *Adenoviridae*; su tamaño oscila entre 90-100nm y su genoma entre 26-45kb, el cual codifica para ~40 proteínas (Charman et al., 2019; Saha & Parks, 2020). Podemos diferenciar su genoma en unidades de transcripción temprana y tardía, las cuales son expresadas antes o después del inicio de la replicación del DNA viral ([Figura 2](#)); las unidades de transcripción temprana son E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4 (Saha & Parks, 2020). E1A codifica para proteínas que interaccionan con reguladores del ciclo celular, reguladores epigenéticos y factores de transcripción, lo que resulta en la entrada de la célula a la fase S del ciclo celular; E1A, además, activa la expresión de todos los demás genes virales (Saha & Parks, 2020). Los productos de E1B están implicados en inhibir apoptosis, regular la respuesta antiviral de la célula, inactivar la respuesta a daño en DNA y regular la expresión de los genes virales (Hidalgo et al., 2019). La región E2 consiste de dos unidades que codifican para proteínas implicadas en la replicación del DNA viral, E2A codifica para la proteína de unión a ssDNA (DBP) y E2B codifica para la proteína pre-terminal (pTP) y la DNA polimerasa viral (Pol) (Saha & Parks, 2020). E3 codifica principalmente para proteínas que tienen funciones inmunomoduladoras, pero también codifica para la proteína de muerte de adenovirus (ADP), la cual aumenta la eficiencia de lisis celular y la liberación de progenie viral (Saha & Parks, 2020). E4 codifica para proteínas que alteran el procesamiento postranscripcional de los mRNA virales tardíos y que previenen la activación de la respuesta a daño en DNA; junto con uno de los productos de E1B (E1B-55K)

ensamblan una E3 ligasa de ubiquitina que induce la degradación de múltiples blancos celulares (Hidalgo et al., 2019).

La unidad de transcripción tardía (MLTU), por otro lado, comprende cinco familias de mRNA (L1-L5), cuyos productos codifican principalmente para proteínas estructurales de la cápside y del *core*; la regulación de la expresión de esta unidad es controlada por el promotor principal tardío (MLP), a partir del cual se produce un único transcrito con cinco diferentes sitios de poliadenilación; los cinco grupos de pre-mRNA producidos por poliadenilación, son procesados posteriormente por splicing alternativo (Charman et al., 2019; Saha & Parks, 2020). Adicionalmente, el genoma de HAdV codifica para otros productos durante la fase intermedia (IX o pIX, IVa2) y tardía (VA RNA I, VA RNA II y la proteína de exón U, UXP) de infección; pIX es una proteína estructural que provee de estabilidad al virión, mientras que VA RNA I y II son moléculas de RNA sintetizadas por la RNA pol III que promueven la síntesis de proteínas virales (Saha & Parks, 2020; Wakabayashi et al., 2019).

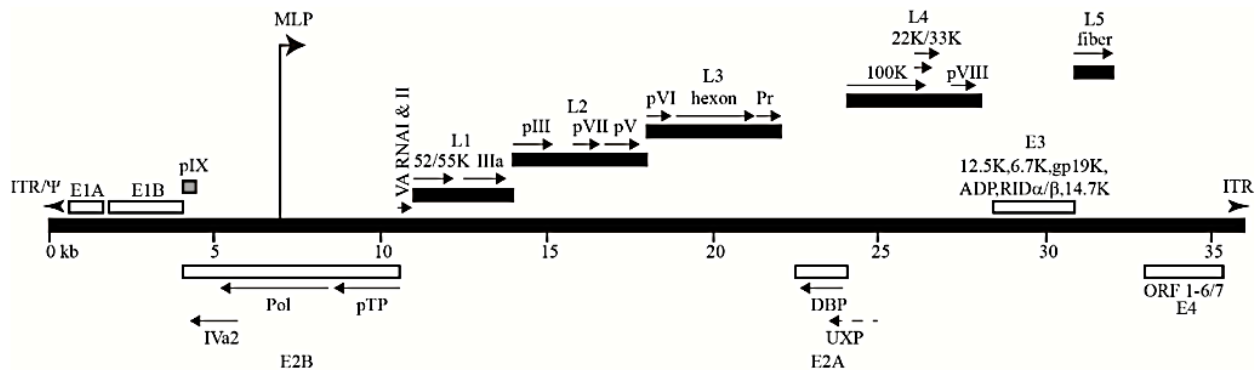


Figura 2. *Genoma de Adenovirus.* Se muestra la localización relativa de las unidades de transcripción temprana (E1-E4, recuadros en blanco) y tardía (L1-L5, recuadros en negro). Las unidades de transcripción que se encuentran por encima de la barra son transcritas hacia la derecha, mientras que las que se encuentran por debajo de la barra son transcritas en sentido contrario. Se muestran también las proteínas asociadas a cada región. Reproducida de Schematic representation of the Human adenovirus (HAdV)-2 genome (36kb), de Saha & Parks, 2020. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091284>.

1.5 Estructura del virión

La estructura general de los viriones maduros se encuentra conservada a lo largo de las diferentes especies de adenovirus (Figura 3). La cápside consiste principalmente de hexones, pentones y proteínas de fibra; la proteína de fibra emerge de cada uno de los vértices del icosaedro y es crucial para la adhesión y entrada a células hospederas; dentro del virión, el DNA viral se encuentra unido a las proteínas VII, V y mu (μ); VII y μ compactan el genoma, mientras que V rodea al complejo VII-DNA (Saha & Parks, 2020). Adicionalmente, las proteínas IIIa, IVa2, VI, VIII y IX actúan ya sea estabilizando a la cápside, asociando a la cápside con el *core* de nucleoproteína o empaquetando el genoma viral (Saha & Parks, 2020). Los receptores utilizados

por HAdV varían entre especies: La especie C se une principalmente al receptor de coxsackie y adenovirus (CAR), mientras que otras especies se unen a la proteína cofactor de membrana (CD46); ambos receptores se expresan en varios tipos celulares, sin embargo, los adenovirus suelen unirse solo a uno u otro receptor; a excepción de la especie D que puede utilizar ambos receptores (Khanal et al., 2018; Saha & Parks, 2020).

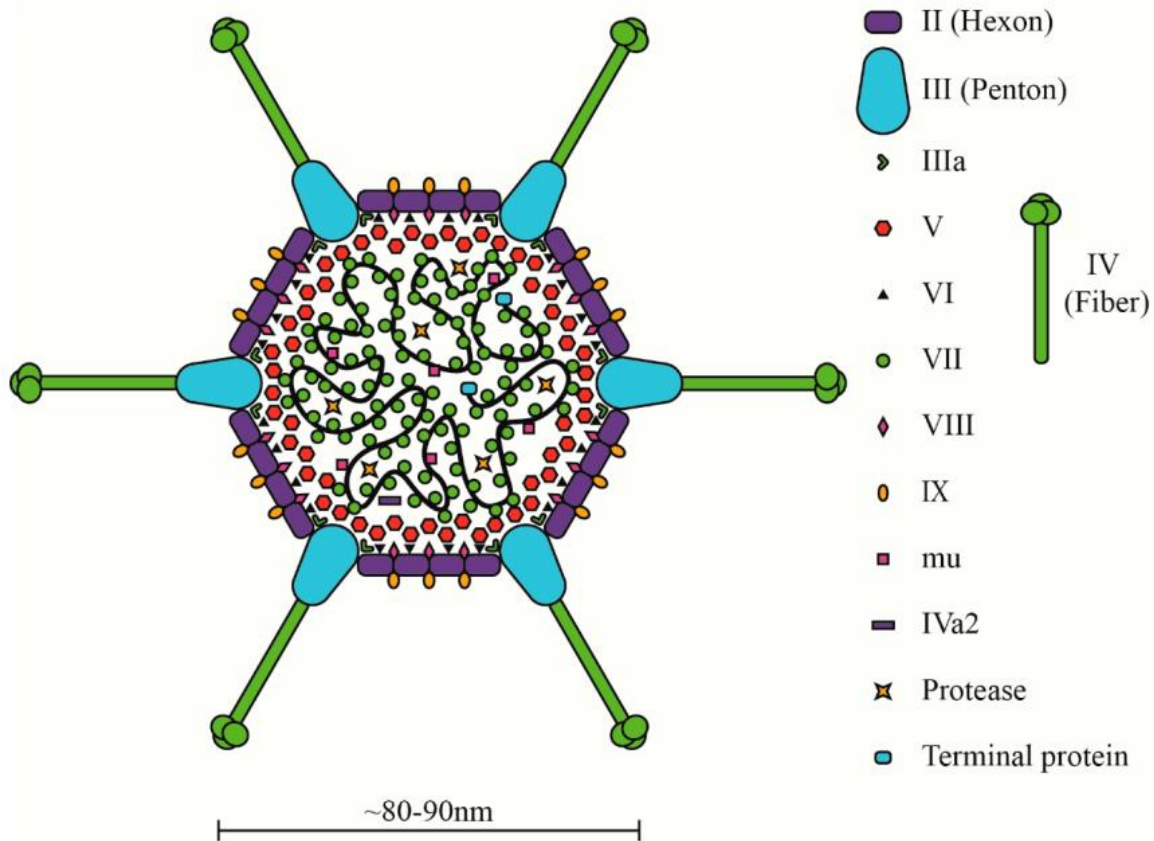


Figura 3. Estructura del virión de Adenovirus Humano. Se muestran las proteínas de la cápside, así como las proteínas del core asociadas con el DNA viral (línea en negro). Reproducida de Structure of the HAdV virion, de Saha & Parks, 2020. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091284>

1.6 Ciclo de Infección

La unión de la proteína de fibra al receptor inicia la entrada del virus a la célula hospedera; la interacción del motivo de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) de las proteínas de pentones con las integrinas celulares $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ induce la internalización del virus por endocitosis en vesículas cubiertas por clatrina que eventualmente formarán endosomas (Saha & Parks, 2020). En el endosoma la cápside se desensambla mediante la proteasa viral y la remoción de proteínas de andamiaje, lo que resulta en viriones que escapan del endosoma mediante la lisis de la membrana del endosoma temprano (Khanal et al., 2018; Saha & Parks, 2020). Los viriones parcialmente desensamblados entonces migran hacia el núcleo a través de la red de microtúbulos por translocación dependiente de dineína (Khanal et al., 2018; Saha & Parks, 2020). Durante la fase

temprana de infección, una vez que el genoma viral entra al núcleo la proteína VII es reemplazada por histonas, formando una estructura parecida a un nucleosoma, similar a la cromatina celular (Saha & Parks, 2020). Poco después de la expresión de los genes tempranos, comienza el proceso de replicación del genoma viral en compartimentos especializados sin membrana (compartimentos de replicación viral, RCs), que permiten concentrar macromoléculas que promueven la replicación del DNA viral y cooptar proteínas para subvertir los mecanismos de defensa antivirales (Charman et al., 2019; Hidalgo & Gonzalez, 2019). La replicación del genoma viral induce la activación completa del MLP y la subsecuente expresión de los genes tardíos; posteriormente, las proteínas estructurales sintetizadas en el citoplasma son transportadas al núcleo para el ensamblaje de la progenie; primero se ensambla la cápside y después se empaqueta el genoma viral dentro de la cápside por actividad del elemento de empaquetamiento ψ (psi), IVa2 y otras proteínas virales (Saha & Parks, 2020). El ciclo de replicación de HAdV concluye con la liberación de los viriones y la muerte de las células infectadas por efectos citopáticos (CPE) y por una actividad no caracterizada de la proteína de muerte ADP descrita anteriormente (Saha & Parks, 2020). El mecanismo general se ilustra en la (Figura 4) (Charman et al., 2019)

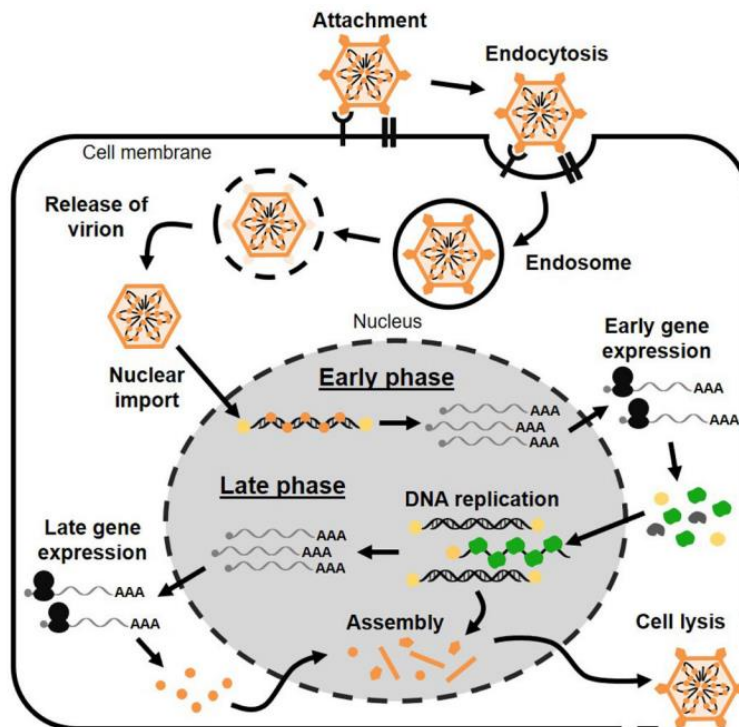


Figura 4. Representación del ciclo de replicación de Adenovirus. La entrada del virus y la importación de los viriones al núcleo resulta en la expresión de las unidades de transcripción temprana (fase temprana) y la replicación del genoma de HAdV. La replicación induce la activación de la unidad de transcripción tardía (fase tardía), lo que posteriormente resulta en el ensamblaje y liberación de la progenie. Reproducida de Overview of HAdV replication cycle, de Charman et. al, 2019. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13695>

1.7 Replicación del DNA de Adenovirus

La replicación del genoma de HAdV sucede en el núcleo de la célula hospedera mediante el uso de diferentes componentes de la maquinaria celular y la formación de compartimentos especializados (Charman et al., 2019; Hidalgo et al., 2021; Hidalgo & Gonzalez, 2019). Durante la fase temprana del ciclo de replicación, la expresión de los genes tempranos inicia después de que el genoma viral ha entrado al núcleo; los productos de estos genes incluyen las tres proteínas que constituyen la maquinaria de replicación de DNA viral: la proteína pre-terminal (pTP), la DNA polimerasa (Ad Pol) y la proteína de unión a DNA (DBP); además de las proteínas virales, dos proteínas celulares son reclutadas para formar el complejo de pre-inicio: el factor nuclear 1 (NF1) y Oct-1 (Charman et al., 2019; De Jong et al., 2003). El mecanismo general se ilustra en la [Figura 5](#) (Flint et al., 2015)

Los orígenes de replicación se encuentran en las repeticiones terminales invertidas (ITRs) que flanquean el genoma; estos contienen el sitio de unión para pTP y la Ad Pol, así como sitios de unión para NF1 y Oct-1; múltiples interacciones proteína-proteína y DNA-proteína entre la maquinaria de replicación viral, NF1, Oct-1 y los orígenes de replicación, resultan en la formación del complejo de pre-inicio (Charman et al., 2019; De Jong et al., 2003).

El heterodímero de la Ad Pol y pTP forma un enlace covalente entre pTP y lo que será el primer nucleótido de la nueva cadena (Charman et al., 2019; De Jong et al., 2003). En HAdV5, la Ad Pol primero une covalentemente un residuo específico de Ser580 de pTP a una desoxicitidina trifosfato (dCTP) para formar el producto pTP-C; la elongación de este producto formará el intermediario pTP-CAT en la posición 4 de la cadena-templado, el cual dará “un salto” hacia las posiciones 1-3 (Charman et al., 2019; De Jong et al., 2003).

NF1 y Oct-1 facilitan la iniciación mediante la alteración conformacional del origen de replicación; DBP, por otro lado, actúa potenciando la unión de la Ad Pol y NF1 al origen de replicación, así como el apareamiento del primer nucleótido con pTP (Charman et al., 2019; De Jong et al., 2003). Después del *priming* de la Ad Pol, ésta se disocia de pTP para comenzar la síntesis de la nueva hebra. El complejo de pre-inicio entonces se desensambla. NF1 se disocia de manera temprana durante la iniciación y Oct-1 es desplazado conforme progresa la horquilla de replicación (Charman et al., 2019; De Jong et al., 2003).

DBP potencia la procesividad de la Ad Pol y facilita la elongación del templado y el desplazamiento de la cadena, mediante la desestabilización de la hélice de dsDNA (Charman et al., 2019; Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994); esta desestabilización depende de la multimerización de DBP en la cadena desplazada (ssDNA) (Charman et al., 2019). A su vez, DBP protege al intermediario de ssDNA de la actividad de nucleasas y regula su alineamiento (Charman et al., 2019; De Jong et al., 2003; Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994). Tanto la molécula de dsDNA recién sintetizada como la hebra de ssDNA desplazada, pueden entrar en rondas subsecuentes de replicación; en el caso de la hebra desplazada, esto es posible debido a que

sus ITRs pueden alinearse por interacciones intramoleculares o intermoleculares, formando así un nuevo origen de replicación de dsDNA (Charman et al., 2019).

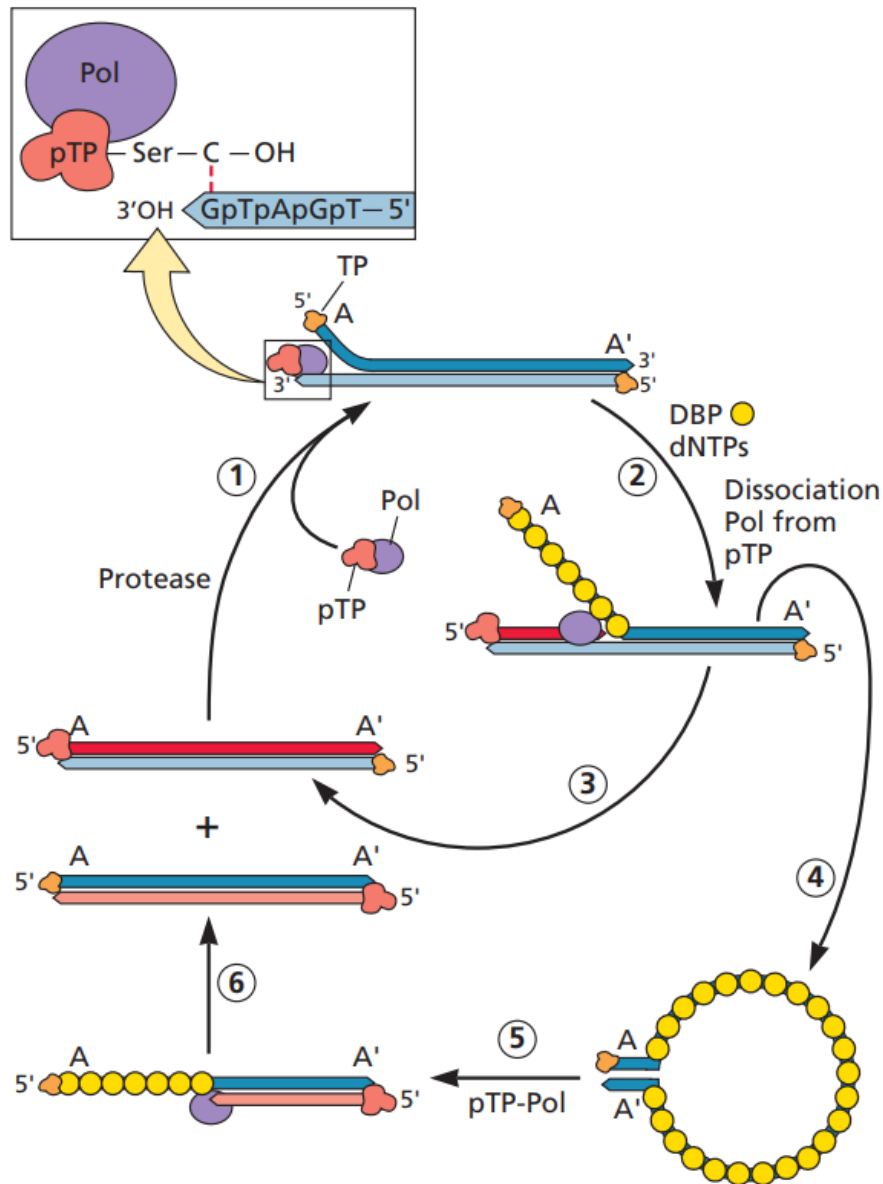


Figura 5. Replicación del genoma de adenovirus. (1) Formación del complejo de pre-inicio en las repeticiones terminales invertidas: Asociación del heterodímero Pol/pTP mediante la formación del enlace covalente entre pTP y el primer nucleótido. (2) Disociación del complejo de pre-inicio, desestabilización de la hélice de dsDNA por actividad de la multimerización de DBP en la hebra desplazada y elongación del templado. (3) Molécula de dsDNA recién sintetizada que puede entrar en rondas subsiguientes de replicación. (4) Formación de un nuevo origen de replicación: Alineación de las ITRs de la hebra desplazada. (5) Ronda subsiguiente de replicación. (6) Molécula de dsDNA recién sintetizada que también puede entrar en rondas subsiguientes de replicación. Reproducida de Replication of adenoviral DNA, de Flint et al., 2015. ISBN: 978-1-55581-934-7.

1.8 Proteína de unión a DNA (DBP)

DBP es una fosfoproteína nuclear multifuncional compuesta por 529 residuos, producto del gen E2A, que puede unirse a ssDNA, dsDNA y RNA de manera no-específica de secuencia (Charman et al., 2019; Hidalgo et al., 2021; Kanellopoulos et al., 1996; Tucker et al., 1994); ésta se une de manera cooperativa y con gran afinidad a moléculas de ssDNA, mientras que la unión a dsDNA es débil y no cooperativa (De Jong et al., 2003; Dekker et al., 1997). Este tipo de proteínas de unión no-específica de secuencia, no poseen dominios comunes ni motivos de interacción con DNA que sean evidentes (Tucker et al., 1994). Su dominio N-terminal (1-173) es intrínsecamente desordenado (Hidalgo et al., 2021), tiene múltiples sitios sujetos a fosforilación, contiene una señal de localización nuclear, está involucrado en el rango de hospederos y se encuentra débilmente conservado (Hidalgo et al., 2021; Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994); de hecho, se ha observado que el dominio N-terminal puede tolerar mutaciones (deleciones e inserciones) en varias regiones de su secuencia, sin resultar en cambios significativos en las distintas funciones de DBP o en la producción de progenie viral (Vos et al., 1989). El dominio no fosforilado C-terminal (174-529) ([Figuras 6 y 7](#)), por otro lado, se encuentra altamente conservado entre varios serotipos, contiene la región de unión a ácidos nucleicos, la cual reconoce entre 10-15 nucleótidos (Charman et al., 2019; Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994) y puede sustituir a la molécula completa de DBP en sistemas de replicación de DNA reconstituidos (Ariga et al., 1980; Kanellopoulos et al., 1996b). También posee una región de 17aa (513-529), denominada brazo C-terminal ([Figuras 6 y 7](#)), implicada en la multimerización de DBP; una hendidura entre la hoja beta 1 y las hélices G y E/F es en donde el brazo C-terminal adyacente de otra DBP se ancla, principalmente mediante interacciones hidrofóbicas ([Figura 7](#)) (Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994). La multimerización entre moléculas de DBP está determinada por las interacciones que forman ciertos residuos del brazo C-terminal (Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994), los cuales se encuentran completamente conservados o sustituidos por aminoácidos equivalentes en, por lo menos, los serotipos -A12, -B7, -C2, -C5, -E4, -F40 y -F41 ([Figura 8](#)) (Tucker et al., 1994). Más aún, los residuos de las depresiones hidrofóbicas con los que interactúa el brazo C-terminal, también se hallan conservados en los serotipos previamente descritos (Tucker et al., 1994). Otros pocos residuos pueden entrar en contacto en la interfaz proteína-proteína entre moléculas de DBP (Kanellopoulos et al., 1996b). La Figura 7 se realizó usando *YASARA View* (Krieger & Vriend, 2014).

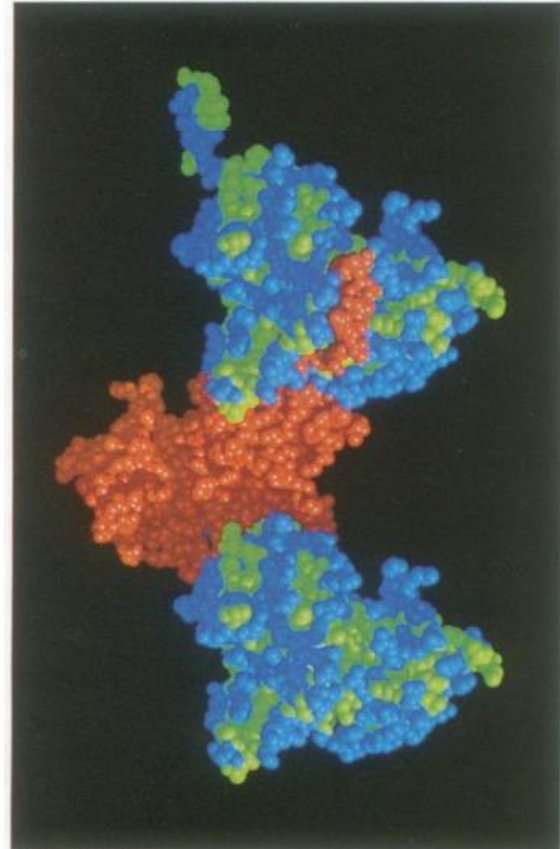
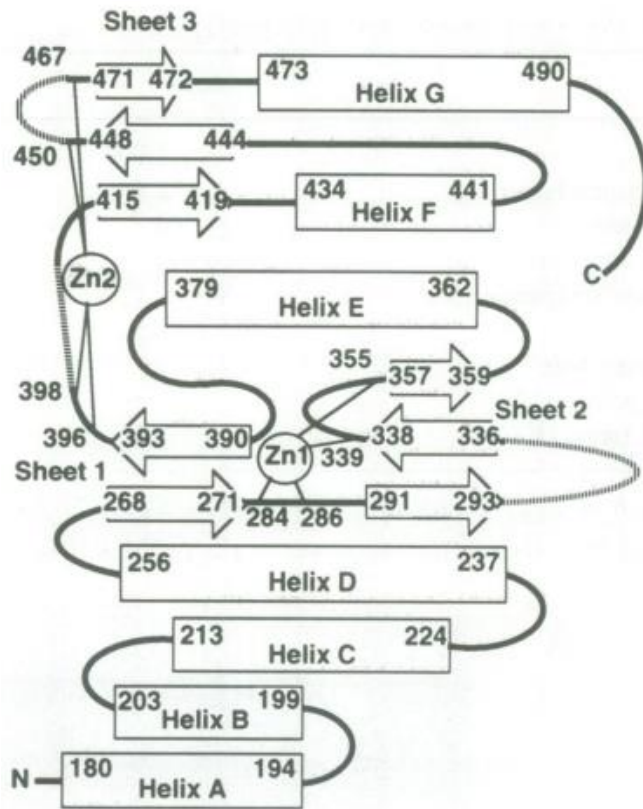


Figura 6. Esquema de las estructuras secundarias del extremo C-terminal de DBP y modelo de un trímero de moléculas de DBP unidas mediante el brazo C-terminal. En el panel del lado izquierdo se muestran los elementos de estructura secundaria, así como los residuos en coordinación con los átomos de zinc; las líneas punteadas representan los segmentos que no pudieron modelarse. En el panel del lado derecho se muestran tres monómeros de DBP; verde = aminoácidos hidrofóbicos o aromáticos; azul = cualquier otro tipo de residuo. Reproducida de *A topological diagram of the structure of DBP & The packing of three molecules along the crystallographic y-axis*, de Tucker et al., 1994. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06598.x>.

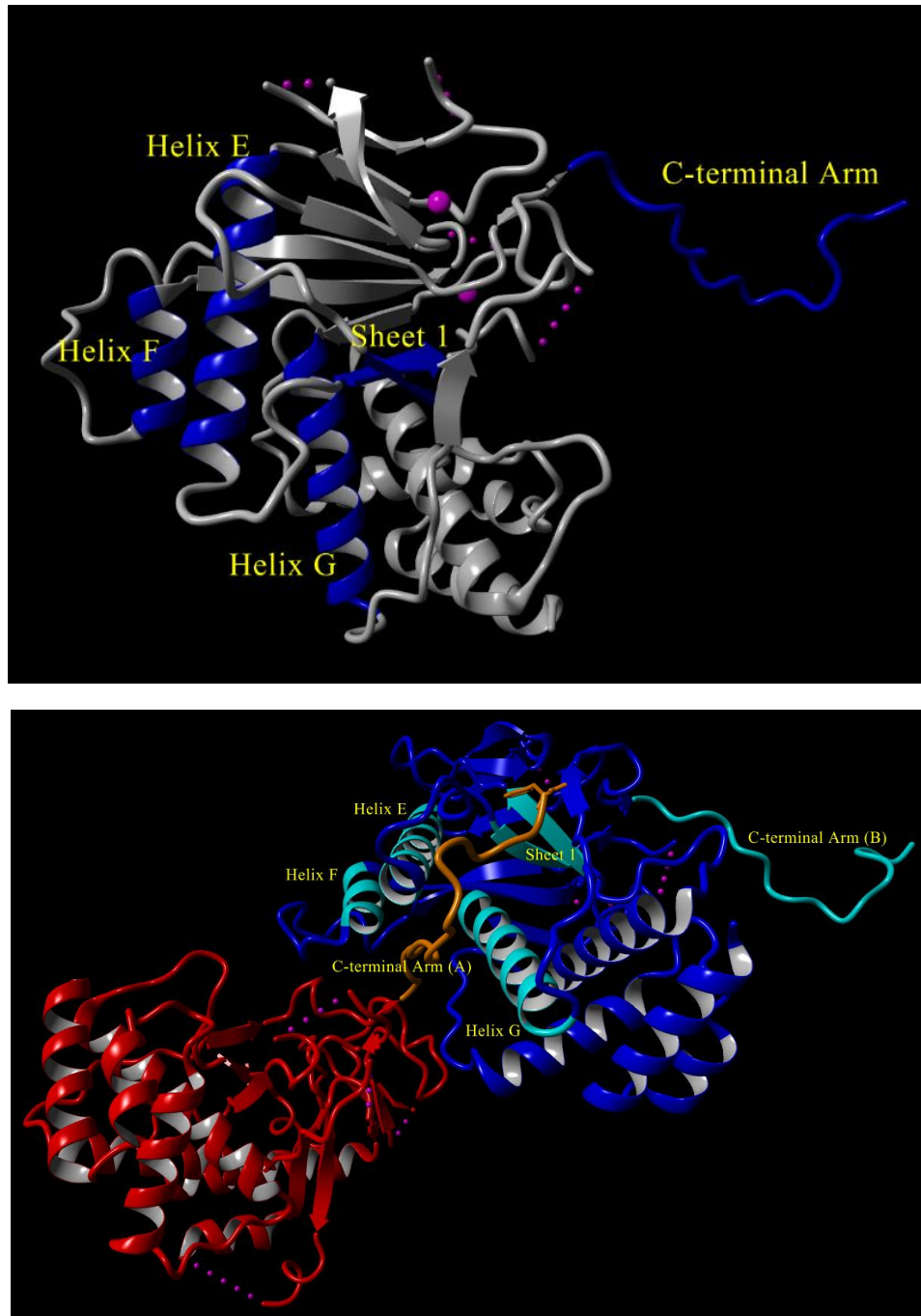


Figura 7. Extremo C-terminal de la proteína de unión a DNA (DBP) de Adenovirus. En el panel superior se muestra un monómero de DBP, en azul se muestra el brazo C-terminal y las regiones en donde se posiciona el brazo C-terminal de una DBP adyacente durante el proceso de multimerización. En el panel inferior se muestra un dímero de DBP, en anaranjado se muestra el brazo C-terminal del primer monómero y en cian se resaltan las mismas regiones previamente descritas para el panel superior. En ambos modelos, las líneas punteadas en magenta corresponden a las regiones que no se han resuelto por cristalografía, y las esferas en magenta representan a los átomos de coordinación de Zinc. PDB: 1ADU. YASARA View—versión 22.5.22.

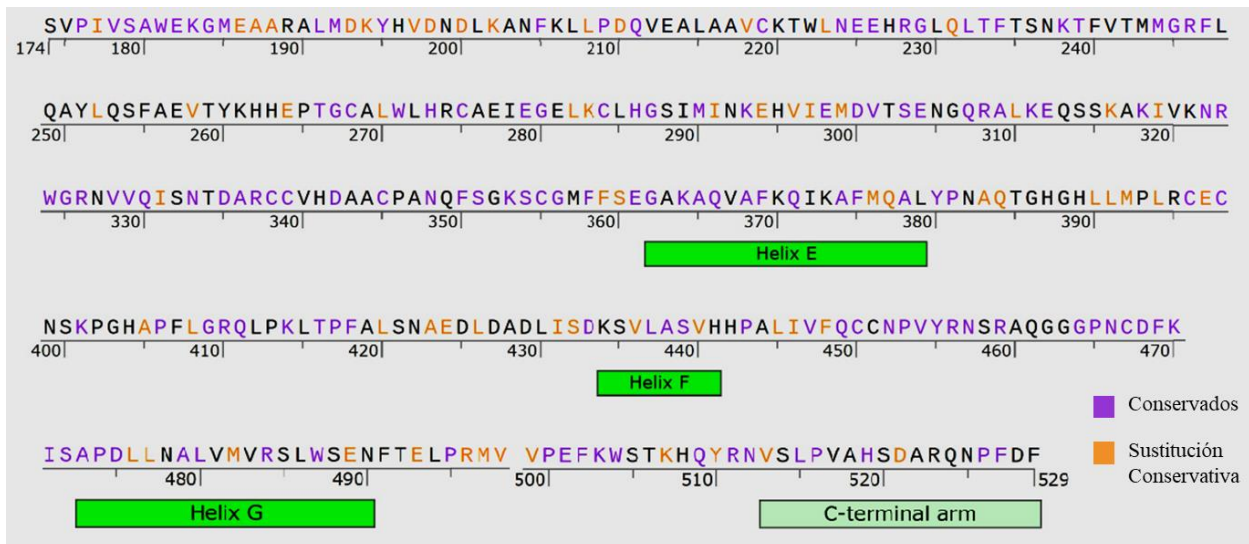


Figura 8. *Aminoácidos Conservados en el extremo C-terminal de DBP.* En color morado se resaltan los aminoácidos conservados y en color anaranjado se resaltan los aminoácidos que presentan sustituciones conservativas. Las sustituciones “conservativas” son: S = T; I = V = L = M = A; F = Y; D = E; K = R; Q = N. Serotipos considerados: A12, B7, C2, C5, E4, F40, F41. Adaptada de Amino acid sequence of the crystallized C-terminal Ad5 DBP fragment, de Tucker et al., 1994. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06598.x>. SnapGene® software (<https://www.snapgene.com>).

1.8.1 Interacciones hidrofóbicas del brazo C-terminal

El residuo F527 se posiciona de manera similar a un gancho, en una depresión hidrofóbica constituida por los residuos L270, M376, L391, V499 y L480 (Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994). El residuo P526 se posiciona contra el residuo Y380 (Tucker et al., 1994). Los residuos V513 y L515 interactúan con los residuos L420, A423, L426, V436 y V440 (Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994). P516 se empaqueta cerca de los residuos P474 y F375 (Tucker et al., 1994). En la (Tabla 2) se indica el estado de conservación y la localización de los residuos. El conjunto de residuos con los que interactúan V513, L515 y P516 conforman una misma depresión hidrofóbica, mientras que el conjunto de residuos con los que interactúan P526 y F527 conforman otra (Figura 9) (Kanellopoulos et al., 1996b).

Tabla 2

Estado de conservación y localización de los residuos.

Residuo	Estado	Localización
F527	Conservado	Brazo C-terminal
L270	Sustitución	Hoja 1
M376	Sustitución	Hélice E
L391	Sustitución	Hoja 1
V499	Sustitución	Próximo a la Hélice G
L480	Conservado	Hélice G
P526	Conservado	Brazo C-terminal
Y380	Conservado	Próximo a la Hélice E
V513	Sustitución	Brazo C-terminal
L515	Conservado	Brazo C-terminal
L420	Sustitución	Próximo a la Hélice F
A423	Sustitución	Próximo a la Hélice F
L426	Sustitución	Próximo a la Hélice F
V436	Sustitución	Hélice F
V440	Sustitución	Hélice F
P516	Conservado	Brazo C-terminal
P474	Conservado	Hélice G
F375	Conservado	Hélice E

Nota: En negritas se muestran los residuos localizados en el brazo C-terminal. Las sustituciones son: S = T; I = V = L = M = A; F = Y; D = E; K = R; Q = N

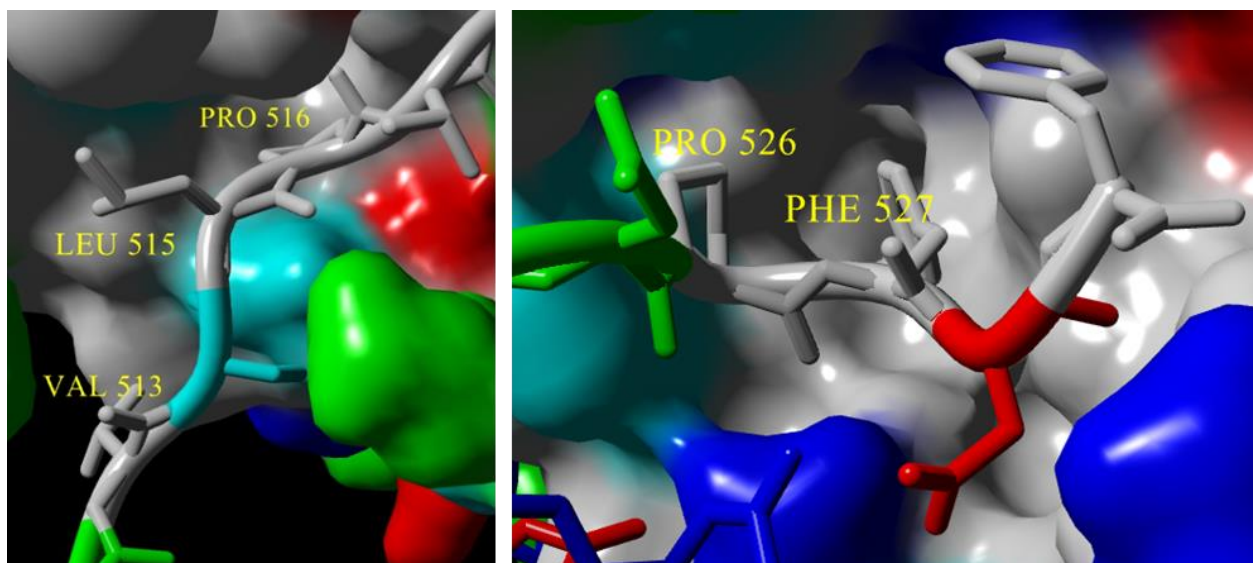


Figura 9. Depresiones hidrofóbicas en donde el brazo C-terminal se ancla. En el panel superior se muestra la región en donde el “gancho” se ancla (P526 y F527). En el panel inferior se muestra la segunda depresión hidrofóbica (V513, L515 y P516). Gris = G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W, C. Verde = N, Q. Rojo = D, E. Cian = S, T. Azul = K, R, H. PDB: 1ADU. YASARA View—versión 22.5.22

1.8.2 Interacciones por enlace de hidrógeno del brazo C-terminal

Las interacciones por enlace de hidrógeno más importantes corresponden al residuo R484 (conservado—hélice G), con el carbonilo de la cadena principal de P526 y la cadena lateral de D521 (sustitución D = E) (Tucker et al., 1994). Existen otras interacciones por enlace de hidrógeno entre R496 (sustitución R = K—próximo a la hélice G) y el carboxilato del extremo C-terminal F529, así como entre el grupo amino de la cadena principal de Q384 (próximo a la hoja beta 1) y N525 (Tucker et al., 1994).

1.8.3 Implicaciones del brazo C-terminal

Se había propuesto que la unión cooperativa de DBP a ssDNA dependía solamente del brazo C-terminal (Kanellopoulos et al., 1996b; Tucker et al., 1994), debido a que en un ensayo por Tucker et. al (1994), la delección de los 17 aminoácidos del brazo C-terminal había resultado en una pérdida total de la capacidad de unión cooperativa de DBP; no obstante, ensayos posteriores mostraron que la delección del brazo C-terminal (Δ N Δ C-DBP) sólo disminuye la capacidad de unión cooperativa de DBP y que otras interacciones proteína-proteína, aunque débiles, pueden formarse para estabilizar el complejo; se ha sugerido que la pérdida total de la capacidad cooperativa de DBP en el primer ensayo por Tucker et. al (1994) fue consecuencia de la preparación de DBP con GST, lo cual resultó en una interferencia de las interacciones proteína-proteína entre monómeros de DBP (Dekker et al., 1997). Aunque Δ N Δ C-DBP aún se une de manera cooperativa a ssDNA, esta no puede formar multímeros (en contraste con moléculas de DBP intacta o con el brazo C-terminal intacto, Δ N-DBP), ni unirse a dsDNA y su afinidad por

ssDNA se reduce hasta 100 veces; Δ N Δ C-DBP no pierde la capacidad de estimular la iniciación, pero sí disminuye su capacidad de desestabilizar dsDNA, por lo que no procede la elongación (Dekker et al., 1997). En resumen, el brazo C-terminal está implicado con la afinidad de DBP por ssDNA y dsDNA, en cierto grado con su actividad cooperativa, y es necesario para que proceda la elongación durante la replicación; todo esto asociado con el hecho de que el brazo C-terminal dirige la multimerización.

Por otro lado, el brazo C-terminal tiene la capacidad de adoptar diferentes conformaciones; al comparar el cristal obtenido por *Tucker et. al* (1994) y los cristales obtenidos por *Kanellopoulos et. al* (1996b) (PDB: 1ADU y 1ADV) no se observan cambios significativos en el dominio C-terminal, más que en la orientación del brazo C-terminal ([Figura 10A](#)). *Kanellopoulos et. al* (1996b) encontraron que los aminoácidos N512 (conservado) y S514 (no conservado) presentan diferencias significativas en los ángulos de torsión ϕ y ψ de la cadena principal y que estos cambios en el ángulo tienen efecto en la variación de la orientación del brazo C-terminal. Es decir, esta región forma un tipo de “bisagra”, responsable de las diferentes conformaciones que puede adoptar el brazo C-terminal (Kanellopoulos et al., 1996b). Análisis posteriores de *Kanellopoulos et. al* (1996a) (PDB: 1ANV) describieron cambios en la estructura del cristal de DBP, al sumergir los cristales en una solución de $K_3UO_2F_5$. El cristal es similar ([Figura 10B](#)), pero no idéntico al descrito por *Tucker et. al* (1994). Los principales residuos responsables de la flexibilidad del brazo C-terminal se hallaron en la misma región de bisagra: de nuevo el residuo N512 (conservado) antes descrito, pero también un residuo distinto, V513 (sustitución conservativa); la conformación del brazo C-terminal, como tal, no presentó cambios significativos ([Figura 10B](#)) (Kanellopoulos et al., 1996a). La información cristalográfica sugiere, por tanto, que los residuos ubicados en la región de bisagra (512-514) son responsables de las diferentes conformaciones que el brazo C-terminal puede adoptar ([Figura 10C](#)). Tiempo después, se llevaron a cabo sustituciones en estos aminoácidos (N512-P, V513-L y NVS512-514-PPP) para darle rigidez a la región de bisagra y analizar la importancia de la flexibilidad en esta región ([Figura 11](#)). Debido a que la cadena lateral de la leucina es más grande que la de cadena lateral de la valina (efecto estérico) y el ángulo ϕ de la prolina se ve limitado por su cadena lateral cíclica, se esperaba que estas sustituciones resultaran en una pérdida de la flexibilidad. Se observó, de manera general, que la elongación del templado durante la replicación es dependiente de la flexibilidad del brazo C-terminal, ya que la pérdida de flexibilidad (PPP-DBP) resulta en una pérdida de la capacidad de DBP de desestabilizar la hebra de dsDNA y, por tanto, de llevar a cabo la elongación del templado; sin embargo, no se observaron cambios significativos en la capacidad de DBP de estimular la iniciación o de unirse a ssDNA (de manera cooperativa) y dsDNA (Van Breukelen et al., 2000).

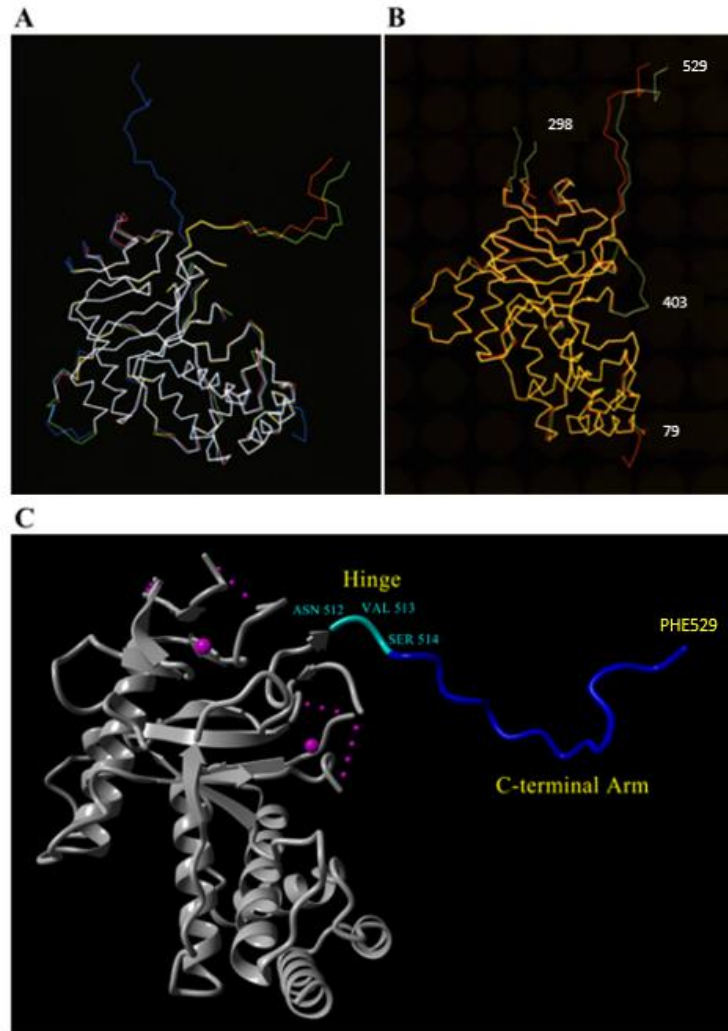


Figura 10. Efecto de la región de bisagra en la orientación del brazo C-terminal. A) Superposición de los cristales obtenidos por Kanellopoulos et. al (1996b) (rojo y verde), con el cristal previamente resuelto por Tucker et al. (1994) (azul). El modelo muestra que la principal diferencia entre los cristales es en la orientación del brazo C-terminal. B) Superposición del cristal obtenido por Kanellopoulos et. al (1996a) (verde), con el cristal previamente resuelto por Tucker et al. (1994) (rojo). De nuevo, la principal diferencia es en la orientación del brazo. C) En cian se muestran los aminoácidos que conforman la región de bigrassa (*hinge*) y en azul el resto del brazo C-terminal; PDB:1ADU. A) Reproducida de *Superposition of the AdDBP second crystal form with the crystal form I AdDBP structure*, de Kanellopoulos et. al, 1996b. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0141>. B) Reproducida de *Superposition of the present structure and the non-derivatized DBP structure*, de Kanellopoulos et. al, 1996a. <https://doi.org/10.1107/S0907444996005525>. C) YASARA View—versión 22.5.22

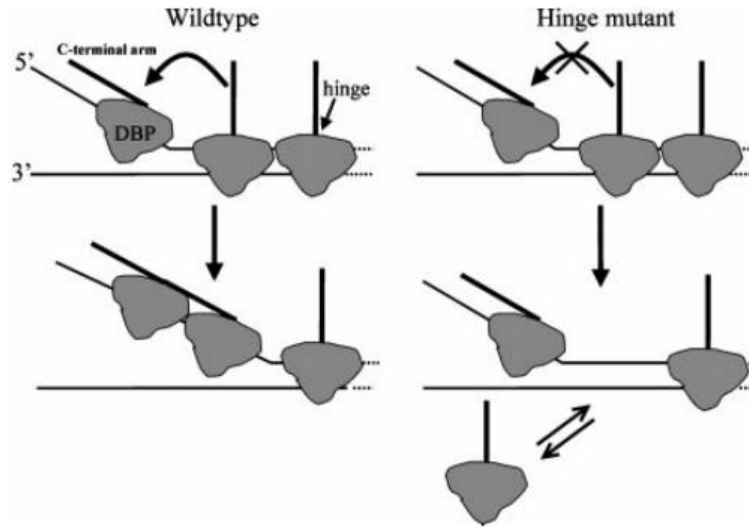


Figura 11. Modelo sobre la importancia de la flexibilidad en la región de bisagra del brazo C-terminal. Los autores proponen que la transición de DBP desde la horquilla de replicación de dsDNA a la hebra de ssDNA requiere que el brazo C-terminal sea flexible. Las moléculas de DBP unidas a dsDNA se ilustran como moléculas separadas, pero es posible que formen múltmeros con conformaciones distintas a los complejos DBP-ssDNA. Reproducida de *A model explaining the need for flexibility of the C-terminal arm*, de Van Breukelen et al., 2000. <https://doi.org/10.1074/JBC.M005745200>.

Otros estudios han mostrado que el brazo C-terminal es el principal determinante de la estabilidad del complejo DBP-ssDNA, pero que también es necesario un loop flexible (294-334) (Figura 12), especialmente para que DBP presente alta afinidad por la horquilla de replicación (Dekker et al., 1998). La multimerización de DBP mediante el brazo C-terminal ($\Delta N\Delta FL$ -DBP) y su saturación por unión cooperativa en la hebra de ssDNA, no es suficiente para que proceda la elongación, requiere del loop flexible para unirse a la horquilla de replicación; a su vez, el loop flexible tampoco es suficiente para que proceda la elongación ($\Delta N\Delta C$ -DBP) (Dekker et al., 1998). La delección del loop flexible disminuye la afinidad de DBP por ssDNA hasta 10 veces (10 veces menos que la ausencia del brazo C-terminal), pero la unión se mantiene cooperativa y no tiene efecto en la estimulación de la iniciación (Dekker et al., 1998).

Adicionalmente, en los ensayos de mutagénesis en donde se introdujeron delecciones o inserciones en el gen E2A que codifica para DBP, cuando se adicionaron 22 aa en el extremo C-terminal, o 5 aa en R484, no se obtuvo progenie viral a partir de los cultivos en células HEK-293 (Vos et al., 1989).

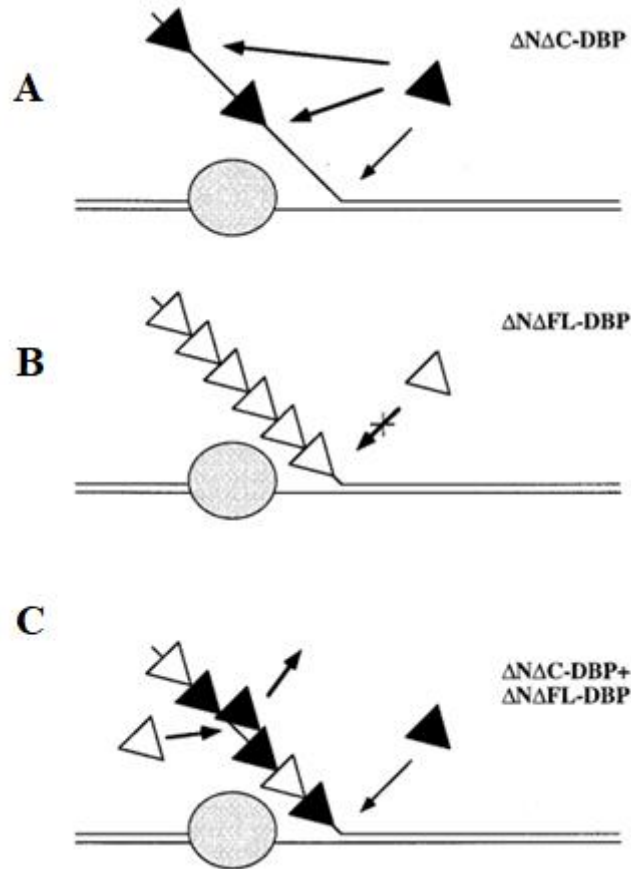


Figura 12. Modelo del efecto del loop flexible y el brazo C-terminal en la desestabilización de DNA durante la elongación. Los triángulos en negro representan al extremo C-terminal de DBP sin el brazo C-terminal ($\Delta N\Delta C\text{-DBP}$). Los triángulos en blanco representan al extremo C-terminal de DBP sin el loop flexible, pero con el brazo intacto ($\Delta N\Delta FL\text{-DBP}$). El círculo representa a la polimerasa viral. A) La hebra desplazada no se satura debido a la disminución en la cooperatividad y no procede la elongación B) La hebra desplazada se satura, pero tampoco procede la elongación. C) $\Delta N\Delta FL\text{-DBP}$ es requerida para saturar la hebra desplazada y probablemente reemplaza a $\Delta N\Delta C\text{-DBP}$ conforme procede la elongación; $\Delta N\Delta C\text{-DBP}$ se une a la horquilla de replicación. Reproducida de *Model of ATP-independent DNA unwinding by DBP*, de Dekker et. al, 1998. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1998.1652>

1.9 Terapias actuales contra adenovirus

Como se ha mencionado anteriormente, las infecciones por HAdV no suelen progresar fatídicamente en pacientes inmunocompetentes, pero en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en niños y recién nacidos, las afecciones no solamente suelen ser severas, sino que su tasa de incidencia es alta. Además, un paciente infectado puede contraer la enfermedad a partir de solamente 5 partículas virales; cuando en el esputo de un adulto infectado, o en una muestra de sangre de un paciente con la infección diseminada, se encuentran entre 10^6 y 10^7 partículas virales por mililitro (Saha & Parks, 2020). Existe una vacuna contra HAdV-4 y -7, la cual es bastante segura y eficiente; sin embargo, esta no se encuentra disponible para el público (Saha & Parks, 2020). Por tanto, es de vital importancia diseñar nuevas terapias antivirales contra HAdV; en especial, porque actualmente no existe ninguna terapia o fármaco aprobado para el tratamiento específico de infecciones causadas por AdV (Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Saha & Parks, 2020).

Las terapias actuales (Tabla 3) incluyen análogos de nucleósidos y nucleótidos, inhibidores de reguladores epigenéticos y compuestos basados en esteroides, entre otros.

Tabla 3

Terapias Actuales

Categoría	Compuesto
Análogos de nucleósidos y nucleótidos	Zalcitabine
	Alvudine
	Stavudine
	Cidofovir
	Análogos de fosfonato de nucleósido acíclico de Cidofovir
	Varios profármacos de éter lípido-éster de Cidofovir
	Gemcitabine
	Cytarabine
	Otros análogos de nucleósidos/nucleótidos
Inhibidores de reguladores epigenéticos	Ácido Valproico
	Vorinostat
	Trichostatin A
	Otros inhibidores HDAC
	Chaetocin
	GSK126
	GSK343
	Lestaurtinib
Compuestos basados en esteroides	Digoxin
	Digitoxin
	Digitoxigenin
	Lanatoside C
	Dexamethasone
	Flunisolide

	Mifepristone
	Epiandrosterone y derivados
	Derivados de Piperazina
	Tazarotene
Otros compuestos	Ivermectin
	Inhibidores de proteasa

Nota: Adaptada de *Novel small molecules with anti-HAdV activity discussed in this review*, de Saha & Parks, 2020. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091284>

1.9.1 Análogos de nucleótidos y nucleósidos

Los análogos de nucleósidos y nucleótidos son fármacos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos; estos compuestos son ampliamente utilizados para tratar infecciones virales, incluyendo las de AdV; sin embargo, estos fármacos suelen asociarse con efectos secundarios graves, una eficacia limitada y un mal pronóstico de la enfermedad en infecciones sistémicas por HAdV en pacientes inmunocomprometidos (Saha & Parks, 2020). No obstante, el tratamiento estándar en la mayoría de los casos de infección por HAdV consiste en la administración de Cidofovir (CDV), un análogo de citosina que interfiere con la síntesis de DNA y que está aprobado para el tratamiento de infecciones por citomegalovirus (HCMV) (Ison & Hayden, 2016; Naesens et al., 2005; Saha & Parks, 2020; Waye & Sing, 2010). De hecho, varios fármacos derivados del Cidofovir han mostrado ser bastante eficientes (Naesens et al., 2005; Saha & Parks, 2020; Waye & Sing, 2010).

Otros inhibidores como el ganciclovir, brincidofovir, ribavirina, zalcitabina, estavudina, gemcitabina y citarabina han mostrado diferentes resultados (Ison & Hayden, 2016; Naesens et al., 2005; Saha & Parks, 2020; Waye & Sing, 2010). El ganciclovir presenta una actividad moderada en infecciones por HAdV, debido a que este profármaco requiere ser modificado por fosforilación en su forma activa y los HAdV no codifican para cinasas virales que faciliten esta modificación en células infectadas (Naesens et al., 2005; Saha & Parks, 2020). El brincidofovir es un fármaco oral que presenta una menor toxicidad renal y de médula ósea, con una mejor captación celular que el cidofovir, pero no es tan eficiente y puede causar toxicidad gastrointestinal en algunos pacientes (Ison & Hayden, 2016; Saha & Parks, 2020). La ribavirina no suele presentar o no presenta actividad contra HAdV (Ison & Hayden, 2016; Naesens et al., 2005; Waye & Sing, 2010). La zalcitabina es un antirretroviral aprobado por la FDA para el tratamiento de infecciones por HIV, la cual exhibe una actividad contra HAdV considerable dentro de un rango de concentración clínicamente alcanzable (Saha & Parks, 2020). La estavudina, que también se utiliza contra HIV, a su vez ha mostrado ser potente contra HAdV (Saha & Parks, 2020; Waye & Sing, 2010). La gemcitabina tiene efecto en la expresión génica y replicación del DNA de HAdV-4, HAdV-5 y HAdV-7, y la citarabina tiene efectos moderados en la expresión génica y producción de progenie de HAdV-5 (Saha & Parks, 2020).

1.9.2 Inhibidores de HDAC y proteínas reguladoras epigenéticas

Por otro lado, algunos inhibidores de histonas desacetilasas (HDAC) que suelen utilizarse en tratamientos de quimioterapia, e inhibidores de metiltransferasas, han mostrado ser eficientes

en prevenir la replicación y proliferación de HAdV; sin embargo, aún se desconocen los mecanismos mediante los cuales estos fármacos afectan la replicación (Saha & Parks, 2020).

1.9.3 Compuestos basados en esteroides

Ninguno de los compuestos mencionados ([Tabla 3](#)) han sido probados en modelos animales de infección por HAdV apropiados o en estudios clínicos (Saha & Parks, 2020). Compuestos como la digoxina y digitoxina, que inducen cambios en la localización de las proteínas SR involucradas en el splicing de RNA celular, afectan el procesamiento temprano de RNA en HAdV-5, lo que resulta en una drástica reducción en la tasa de replicación y producción de progenie (Saha & Parks, 2020). Otros compuestos, como la digoxina, digitoxigenina y el lanatósido C, reducen la expresión de genes tardíos en HAdV-4 y HAdV-7 (Saha & Parks, 2020).

1.9.4 Alternativas

A pesar de que se han desarrollado varias aproximaciones en el diseño de fármacos contra AdV, las opciones actuales son limitadas y relativamente ineficientes, por lo que el desarrollo de terapias más efectivas es una necesidad (Saha & Parks, 2020). Además, hasta la fecha se han realizado pocos análisis de cribado virtual para encontrar nuevos compuestos que presenten actividad contra HAdV (Saha & Parks, 2020).

1.10 Inhibidores de interacción proteína-proteína (PPIs)

Se ha reportado que más del 80% de las proteínas conocidas hasta la fecha funcionan formando complejos, principalmente con otras proteínas o ácidos nucleicos, en donde las interacciones intermoleculares que se forman son determinantes para llevar a cabo sus diversas funciones celulares (Buchwald, 2010; Farooq et al., 2021; Rabbani et al., 2018). Las interacciones proteína-proteína (PPIs), pueden ser clasificadas de varias maneras con base en sus diferentes características estructurales o funcionales; con base en su superficie de interacción, las PPIs pueden ser homo-oligoméricas (constituidas por un mismo tipo de subunidad) o hetero-oligoméricas (constituidas por diferentes tipos de subunidades); en función de su estabilidad, pueden ser obligadas o no-obligadas; y acorde con su persistencia, pueden ser transitorias o permanentes (Rabbani et al., 2018).

Debido a que las interacciones proteína-proteína juegan un rol crítico en los procesos biológicos tanto en condiciones fisiológicas normales como en condiciones patológicas, inhibir estas interacciones se ha convertido en un blanco terapéutico de especial interés (Buchwald, 2010; Farooq et al., 2021; Rabbani et al., 2018). No obstante, el diseño de estos inhibidores (PPIs) representa un gran reto, debido a que las regiones implicadas no suelen poseer varias de las características que se toman en consideración durante la selección de blancos biológicos en el diseño de fármacos (e.g. tamaño y forma). En contraste con los blancos de la mayoría de los fármacos existentes (receptores acoplados a proteínas G, canales iónicos y enzimas), las regiones implicadas en interacciones proteína-proteína suelen ser grandes ($1,500-3,000 \text{ \AA}^2$) y “planas” (no suelen poseer *pockets* o cavidades bien definidas) (Buchwald, 2010).

Utilizar moléculas pequeñas, como la mayoría de los fármacos tradicionales, no pareciera ser viable; sin embargo, estas regiones de interacción suelen poseer “*hot spots*”, partes relativamente pequeñas de la interfaz que son esenciales para la unión de alta afinidad y que permiten delimitar el blanco biológico; por tanto, es posible diseñar PPIIs (antagonistas) ortostéricos, que actúen directamente en la interfaz, interfiriendo y compitiendo con la proteína-ligando original; o diseñar PPIIs alostéricos, que se unan a otra región de la proteína, induciendo cambios conformacionales suficientes como para interferir con la región de unión de la proteína-ligando (Basse et al., 2016; Buchwald, 2010). Aun así, el tamaño importa. Para que un PPII ortostérico sea efectivo, la molécula pequeña debe presentar una afinidad comparable a la de la proteína, lo cual resulta difícil de lograr cuando las cavidades en donde puede unirse la molécula suelen ser más pequeñas que en los blancos biológicos tradicionales (espacio químico); esto resulta en la necesidad de que la molécula sea más grande para que pueda establecer contacto con el mayor número de cavidades pequeñas posibles y, por tanto, formar un mayor número de interacciones (e.g. hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, electrostáticas) (Buchwald, 2010). No obstante, el tamaño también afecta la permeabilidad de la molécula, por lo que es más complicado diseñar PPIIs que puedan atravesar la membrana plasmática y actúen contra un blanco intracelular, que diseñar inhibidores que actúen contra blancos biológicos extracelulares (Buchwald, 2010).

A pesar de que se han logrado identificar varias moléculas pequeñas capaces de actuar como inhibidores de interacciones proteína-proteína e incluso ya existen fármacos en el mercado que actúan bajo este principio (e.g. tirofiban o maraviroc), algunos de estos inhibidores no suelen considerarse estrictamente PPIIs, pues no actúan sobre la superficie de las regiones de interacción y su mecanismo de acción recuerda más bien al diseño de fármacos tradicional (Buchwald, 2010). No obstante, existen bases de datos (e.g. 2P2idb y TIMBAL) que albergan, específicamente, moléculas pequeñas que actúan como PPIIs (Basse et al., 2016; Higuieruelo et al., 2013).

Debido a que la desestabilización de la hebra de dsDNA y la estabilización de la hebra ssDNA durante la replicación del DNA de adenovirus es principalmente dependiente de las interacciones proteína-proteína que establece el brazo C-terminal de DBP con un monómero adyacente de DBP, en este estudio se propone el diseño de PPIIs capaces de actuar como inhibidores de la multimerización de DBP.

II. Hipótesis

Si los monómeros de DBP no se multimerizan, entonces no procede la elongación en la síntesis de DNA viral y, por tanto, se inhibe la replicación de adenovirus. Inhibir la interacción del brazo C-terminal con las depresiones hidrofóbicas formadas por la hoja beta 1 y las hélices G y E/F, es suficiente para inhibir la dimerización de DBP.

2.1 Justificación

Debido a que los adenovirus son patógenos ubicuos que pueden causar varios tipos de enfermedades que suelen progresar fatídicamente en pacientes inmunocomprometidos, es necesario diseñar terapias efectivas contra estos virus; en especial porque la vacuna existente no se encuentra disponible para el público y tampoco existe terapia aprobada para el tratamiento específico de infecciones por adenovirus. Ya que la mayoría de las aproximaciones que se han realizado hasta la fecha se han basado en lo que sabemos acerca de otros fármacos que presentan actividad contra otros virus de DNA, en este estudio se propone abordar una aproximación distinta: ¿Qué sabemos, específicamente, sobre adenovirus? Sabemos que la desestabilización de la hebra de dsDNA y la estabilización de ssDNA durante la replicación del DNA de adenovirus es, en general, dependiente de las PPIs que se establecen durante la multimerización de DBP mediante el brazo C-terminal. Diseñar un inhibidor de interacción proteína-proteína (PPII) que actúe como antagonista ortostérico de las regiones implicadas en la multimerización de DBP, sería capaz de inhibir la replicación del DNA de adenovirus.

Actualmente no existe información respecto al rol específico de cada uno de los residuos del brazo C-terminal durante la multimerización, pero se han identificado dos cavidades hidrofóbicas en donde los residuos V513, L515, P516, P526 y F527 se anclan. En este estudio se realizó un análisis *in silico* de las interacciones que forman los residuos conservados del brazo C-terminal durante la dimerización de DBP, enfocado principalmente en los residuos 525-529. Los residuos 525-529 se posicionan de manera similar a la “punta de un gancho” en una cavidad hidrofóbica que, por su forma, se ha propuesto como blanco biológico en el diseño de PPIIs.

2.2 Objetivo general

Proponer una serie de compuestos capaces de actuar como inhibidores de la dimerización de DBP, a partir de la evaluación *in silico* de mutaciones de los residuos implicados en la multimerización de DBP.

2.3 Objetivos particulares

1. Identificar el tipo de interacciones y el grado de contribución de los residuos conservados del brazo C-terminal, en la interfaz entre un dímero de DBP.
2. Proponer una serie de compuestos que mimeticen a los residuos implicados en la multimerización de DBP.

3. Evaluar mediante análisis de acoplamiento molecular la capacidad de unión de los compuestos propuestos a la región de unión del brazo C-terminal.

III. Materiales y Métodos

En la (Figura 13) se muestra un diagrama general sobre los análisis realizados y los principales softwares utilizados.

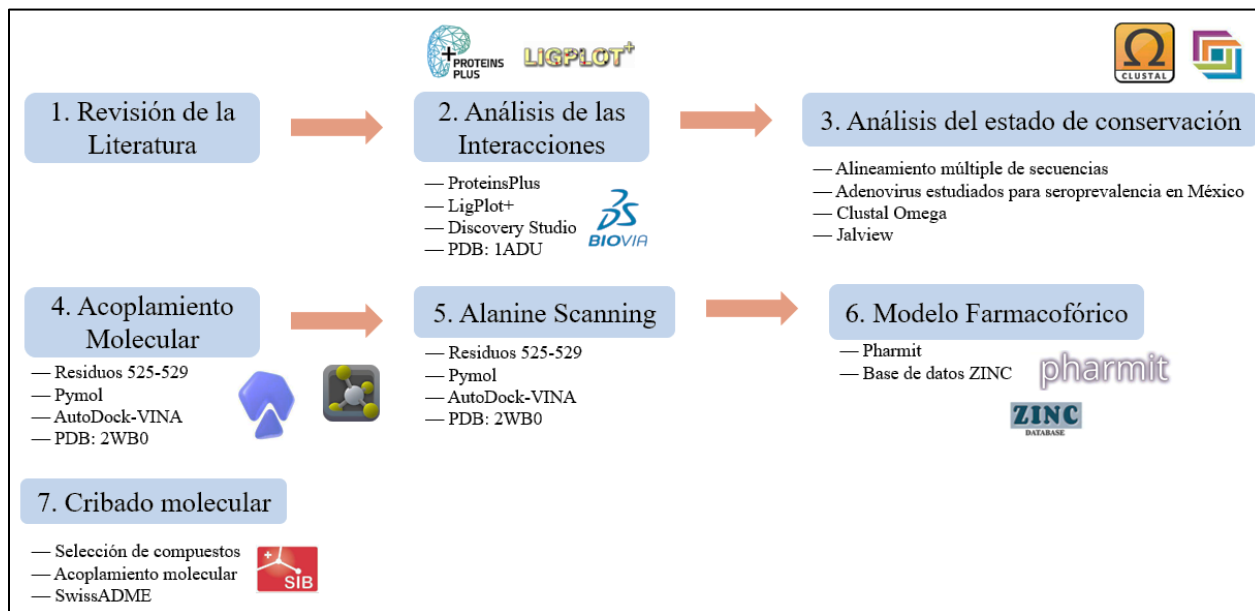


Figura 13. Diagrama general de la metodología.

3.1 Análisis de las Interacciones

Actualmente existen cuatro cristales de Δ N-DBP (PDB: 1ANV, 1ADU, 1ADV y 2WB0). Los cristales 1ANV y 2WB0 son monómeros de DBP, mientras que 1ADU y 1ADV son dímeros de DBP unidos mediante el brazo C-terminal. Ningún cristal incluye el extremo N-terminal, debido a que es intrínsecamente desordenado (Hidalgo et al., 2021). Para el análisis de las interacciones se utilizó el cristal 1ADU, debido a que se encuentra en forma de dímero y presenta una mejor resolución (3.00Å) que 1ADV (3.20Å).

Al momento de analizar un complejo proteína-proteína del *Protein Data Bank*, es importante verificar que el complejo sea biológicamente relevante y que no se deba únicamente a las condiciones del cristal (Fährrolfes et al., 2017; Krissinel & Henrick, 2007). *ProteinsPlus* (<https://proteins.plus>) cuenta con HyPPI, una herramienta que permite discriminar entre complejos biológicos (permanentes o transitorios) y artefactos del cristal (Fährrolfes et al., 2017; Schneider et al., 2012; Schöning-Stierand et al., 2020). HyPPI se basa en dos descriptores: la energía de unión hidrofóbica y la proporción de las relaciones de interfaz (coeficiente IF) (Fährrolfes et al., 2017; Schneider et al., 2012; Schöning-Stierand et al., 2020). La energía de unión hidrofóbica se calcula con base en el término de desolvatación de la función de puntaje HYDE, mientras que el coeficiente IF mide la proporción del área de interfaz relativa de las subunidades con respecto a la superficie molecular de la subunidad no unida (Fährrolfes et al., 2017; Schneider et al., 2012;

Schöning-Stierand et al., 2020). De esta manera se verificó que las interacciones del brazo C-terminal del cristal 1ADU fuesen biológicamente relevantes.

Las interacciones intermoleculares o *fuerzas químicas no-covalentes* que se establecen entre la interfaz de un complejo ligando-receptor, determinan la especificidad, fuerza y estabilidad de unión del complejo; el análisis de estas interacciones (e.g. enlaces de hidrógeno, apilamientos π - π o puentes salinos) permite elucubrar a nivel atómico, aproximaciones sobre la manera en que las subunidades de un complejo interactúan, lo cual resulta de especial interés en el diseño racional de fármacos (Freceer, 2011; Zhou et al., 2012). Para analizar y visualizar las interacciones del brazo C-terminal entre monómeros de DBP, se editó el cristal 1ADU mediante *Pymol* para sólo conservar la secuencia del brazo C-terminal (18aa) unida al monómero adyacente de DBP (Schrödinger LLC, 2020). Después se analizó el complejo mediante *LigPlot+*, la versión actualizada de *LIGPLOT* (Laskowski & Swindells, 2011). Este programa permite generar diagramas en 2D, a partir de archivos *pdb*, de las interacciones hidrofóbicas y por enlace de hidrógeno de complejos ligando-proteína o complejos proteína-proteína (Laskowski & Swindells, 2011). Debido a que *LigPlot+* reconoce solamente dos tipos de interacciones intermoleculares, posteriormente se utilizó *Discovery Studio*; sin embargo, el tamaño del brazo C-terminal (18aa) es demasiado grande como para generar diagramas 2D de las interacciones en este programa (BIOVIA Dassault Systèmes, 2021). Por tanto, para identificar el tipo de interacciones que forman los residuos del brazo C-terminal se tuvo que volver a utilizar *Pymol* para generar dos archivos *pdb*: uno con los residuos 512-520 y otro con los residuos 521-529.

3.2 Análisis del estado de conservación

Para este análisis se utilizaron los tipos de adenovirus que están siendo actualmente estudiados en el grupo para seroprevalencia en México (Tabla 4). Se generó un archivo con todas las secuencias de interés en formato FASTA y posteriormente se llevó a cabo el alineamiento múltiple de secuencias mediante *Clustal Omega* (Madeira et al., 2022). Una vez obtenidos los resultados, se utilizó *Jalview* para visualizar el alineamiento (Waterhouse et al., 2009). Esto nos permitió identificar el estado de conservación de los residuos del brazo C-terminal y de aquellos otros residuos con los que interactúan los aminoácidos de interés en este estudio.

Tabla 4

Tipos de adenovirus utilizados en el alineamiento múltiple de secuencias.

Tipo de Adenovirus	Código NCBI	Abreviación Figura 17
Human adenovirus 5	>pdb 1ADU A	H5
Human adenovirus 12	>CAA24732.1	H12
Human adenovirus 6	>ADV03663.1	H6
Human adenovirus 41	>AAA42463.1	H41
Human adenovirus 36	>ACY04474.1	H36
Human adenovirus 26	>ABO61318.1	H26

Human adenovirus 14	>AXN74046.1	H14
Human adenovirus 4a	>BBH49393.1	H4a
Human adenovirus 4b	>BAU59233.1	H4b
Simian adenovirus 21	>AP_000277.1	S21
Simian adenovirus 25	>AP_000315.1	S25
Rhesus adenovirus 63	>AUG71809.1	R63
Chimpanzee adenovirus Y25	>YP_006272965.1	C25

Nota: El código de abreviación pertenece a la [sección 4.2](#) de resultados.

3.3 Acoplamiento Molecular y Alanine Scanning

Conocer la estructura tridimensional de una proteína provee de información necesaria para entender mejor su funcionamiento, lo cual implica elucubrar la manera en que sus residuos, a nivel atómico, interaccionan unos con otros; actualmente (con base en las estadísticas del *Protein Data Bank*), la cristalografía de rayos X, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), la cristalografía electrónica, la microscopía electrónica y la tomografía electrónica, son los principales métodos para obtener información detallada sobre la localización particular de cada átomo en relación con los demás átomos presentes en una molécula dada; sin embargo, cada uno de estos métodos presenta ciertas limitaciones al momento de analizar complejos de proteínas (Berman et al., 2000; Dominguez et al., 2003; Kozakov et al., 2017). Los métodos de acoplamiento molecular, o *docking*, se han desarrollado en los últimos años en afán de obtener modelos que describan y predigan, detalladamente, la interacción entre moléculas; no obstante, las herramientas computacionales actuales aún no son suficientes para resolver estas estructuras por sí solas, en especial para discriminar entre los modelos obtenidos; por tanto, la información bioquímica obtenida por otros métodos, como la mutagénesis dirigida o el entrecruzamiento de proteínas (entre otros), se ha implementado en conjunto con los métodos de acoplamiento molecular (Dominguez et al., 2003; Karaca & Bonvin, 2013; Kozakov et al., 2017).

Con base en esto, se propuso utilizar el acoplamiento molecular para evaluar 1) la energía de afinidad y la forma en que se acoplan los residuos 525-529, 2) el cambio en la energía de afinidad cuando estos residuos son sustituidos por alaninas y 3) la energía de afinidad y la forma en que se acoplan compuestos análogos a los residuos 525-529. Para realizar estos análisis se utilizó el cristal 2WB0, debido a que presenta la mejor resolución (1.95Å).

Ya que los átomos de zinc en el cristal no son relevantes para el acoplamiento, estos se eliminaron del cristal 2WB0 mediante *pdbtools* (Jiménez-García et al., 2021). Los residuos 525-529 se extrajeron del cristal 2WB0 en formato *pdb* mediante *Pymol* y se reescribió el archivo en formato *mol2* mediante *Avogadro* (Hanwell et al., 2012). Posteriormente se llevó a cabo la preparación del receptor 2WB0 mediante *AutoDock-VINA* (Eberhardt et al., 2021; Morris et al., 2009; Trott & Olson, 2010). Se eliminaron las moléculas de agua, se añadieron solamente hidrógenos polares y se “fusionaron” (*merged*) los no-polares; después se añadieron las cargas de

Kollman. Entonces se añadió el ligando (residuos 525-529) en formato *mol2*. Tanto el receptor como el ligando fueron reescritos en formato *pdbqt*.

El tamaño y posición de la caja de acoplamiento (*grid box*) (Tabla 5) se realizó con base en la información obtenida previamente sobre los aminoácidos que interactúan con los residuos 525-529, los cuales se encuentran entre la hoja beta 1y las hélices E/G. Los parámetros del ligando se establecieron como aleatorios y el acoplamiento se realizó mediante *VINA* en su opción predeterminada (Eberhardt et al., 2021; Trott & Olson, 2010). Los resultados se visualizaron mediante *AutoDock-Tools*. El acoplamiento del péptido wild type se realizó 5 veces con 5 semillas aleatorias distintas, dando un total de 45 poses. Las mutaciones de cada uno de los residuos por alaninas se realizaron en *Pymol* y se repitió el procesamiento del ligando. Para cada péptido mutado el acoplamiento también se realizó 5 veces con 5 semillas aleatorias distintas.

Tabla 5.

Configuración de la caja de AutoDock-Vina

	x	y	z
Centro	35.353	45.31	8.693
Tamaño	16.5	15.75	21.0

3.4 Modelo Farmacofórico y Cribado Molecular

Para diseñar el modelo farmacofórico se utilizó un monómero del cristal 1ADU (cadena B) y los residuos 525-529 del mismo cristal, pero del otro monómero (cadena A); ambos archivos fueron generados mediante *Pymol*. De esta manera, al cargar los archivos en *Pharmit* el programa reconoce a los residuos 525-529 (cadena A) como ligando del monómero completo (cadena B). Con base en los resultados del acoplamiento molecular del péptido wild type (WT) y los péptidos mutados, se eligieron grupos funcionales y características de la forma del péptido para diseñar el primer modelo farmacofórico. Este modelo se utilizó para discriminar entre compuestos y confórmers de la base de datos *ZINC*, la cual alberga compuestos disponibles en el mercado (Sterling & Irwin, 2015).

Pharmit permite especificar un valor límite de RMSD de la pose minimizada a partir de la pose inicial y filtrar la búsqueda mediante una función de energía que minimiza los resultados usando *smina* (una variante de *AutoDock-Vina*), mediante la función de puntaje predeterminada de *VINA* (Koes et al., 2013; Sunseri & Koes, 2016). Durante la búsqueda de compuestos a partir del primer modelo no se estableció un valor límite de RMSD o de energía de afinidad, pues sólo 33 compuestos cumplían con las características del modelo farmacofórico. Ya que los compuestos encontrados presentaban una energía de afinidad menor al péptido WT y valores de RMSD de hasta 6Å, se propuso un nuevo modelo “simplificado”.

El segundo modelo permitió identificar hasta 30 compuestos con una energía de afinidad $\leq -7\text{kcal/mol}$ y un RMSD $\leq 2.0 \text{ \AA}$. De los 30 compuestos encontrados, se seleccionaron 12 para evaluar mediante análisis de acoplamiento molecular. Los compuestos seleccionados presentan una energía de afinidad minimizada $< -7.3 \text{ kcal/mol}$; se utilizó este valor debido a que la energía de afinidad de las poses del péptido WT que son similares a lo observado en el cristal en forma de dímero, son iguales a -7.3 kcal/mol . Mediante *Open Babel GUI*, los archivos *sdf* de la base de datos ZINC se convirtieron a formato *pdbqt* (O’Boyle et al., 2011). El proceso de acoplamiento de los 12 compuestos mediante *VINA* se realizó de la misma manera que los acoplamientos del péptido ([sección 3.3](#)) y se repitió por lo menos 3 veces con 3 semillas aleatorias para cada uno de los compuestos.

Finalmente, mediante el servidor de *SwissADME* se computaron las propiedades de los compuestos con mayor energía de afinidad (Daina et al., 2014, 2017; Daina & Zoete, 2016).

IV. Resultados

4.1 Análisis de las interacciones

Para verificar que las interacciones proteína-proteína en el complejo fuesen biológicamente relevantes, se utilizó la herramienta HyPPI de *ProteinsPlus* para analizar el cristal 1ADU ([Tabla 6](#)). Los complejos proteína-proteína clasificados como permanentes suponen que el complejo es estable solamente en este estado, mientras que los complejos clasificados como transitorios suponen que las subunidades son estables tanto en forma de complejo como monómeros (Fährrolfes et al., 2017; Schöning-Stierand et al., 2020). Los resultados sugieren que las interacciones en el complejo no se deben a artefactos del cristal; por tanto, resulta de especial interés poder visualizarlas. Sin embargo, la herramienta HyPPI de *ProteinsPlus* no pudo determinar completamente si el complejo es permanente o transitorio.

Tabla 6

Clasificación de las interacciones proteína-proteína en el cristal 1ADU

Clasificación de la interfaz entre los monómeros	
Complejo Permanente	34%
Complejo Transitorio	66%
Artefacto del Cristal	0%

4.1.1 Interacciones hidrofóbicas resueltas por LigPlot+

Para poder visualizar las interacciones hidrofóbicas que se establecen en la interface entre el brazo C-terminal y un monómero adyacente de DBP, se utilizó *LigPlot+*. Algunas de las interacciones descritas en la literatura ([sección 1.8.1](#)) no se observaron en el diagrama resuelto por *LigPlot+* ([Tabla 7](#)) ([Figura 14](#)); no obstante, el programa permitió identificar el resto de las interacciones hidrofóbicas que establecen los demás residuos que componen el brazo C-terminal.

Tabla 7

Interacciones hidrofóbicas

Residuo (A)	Residuos (B)
V513	A423, L426, L420, V436, V440
S514	L232, T233, A423, Q231,
L515	T233, A423, L426, L420, V436, V440
P516	T233, S439, P474, L445, F375
V517	V436
A518	N478, L379, F375, S435, V481
H519	N478, L379, V481, M482
D521	V481, R484, Y380
R523	R484, Y380
Q524	Y380, 362, A383
N525	A383, Q384
P526	R484, Y380, A383, G386, T385
F527	G386, M376, L270, L391, V499, L480
D528	M497, V498
F529	T385, L270, H389, R496, E501

Nota: (A) Residuos del brazo C-terminal. (B) Residuos con los que interactúa el brazo C-terminal. En **negritas** se indican los residuos previamente descritos ([sección 1.8.1](#)) y en **rojo** los que no se observaron en el diagrama resuelto por LigPlot+.

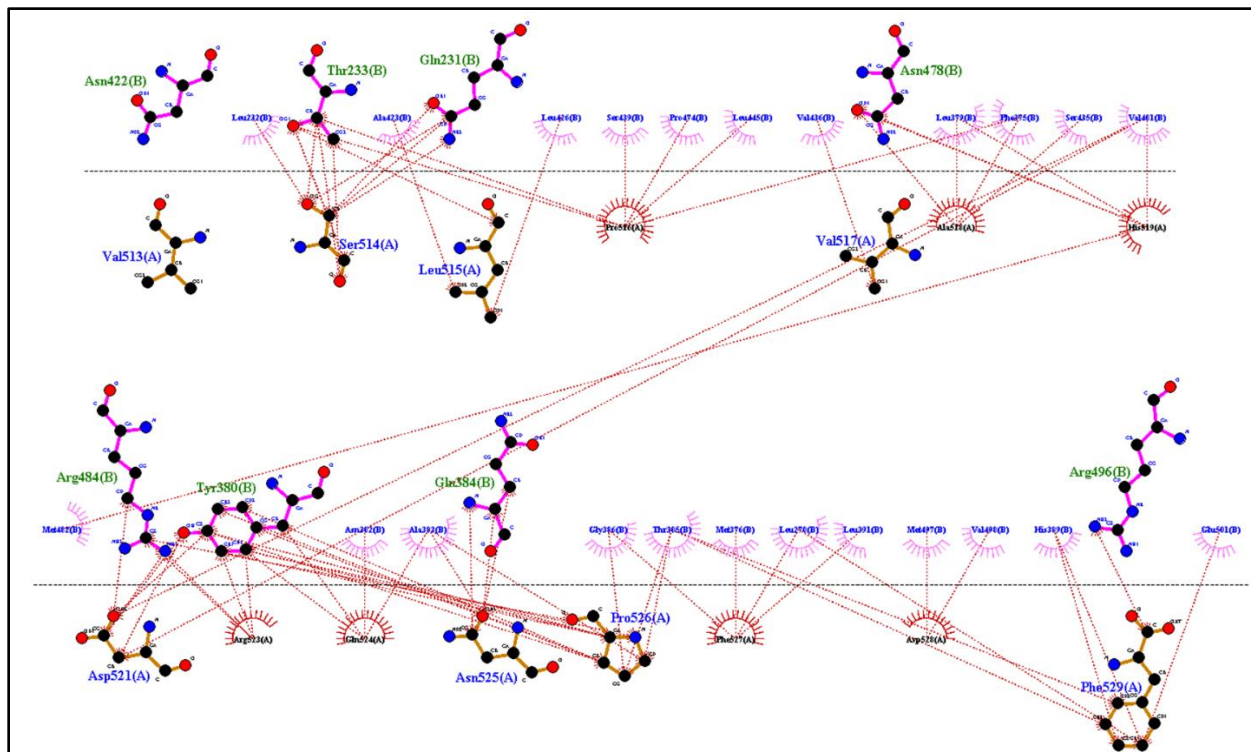


Figura 14. Diagrama en 2D de las interacciones hidrofóbicas. Los residuos debajo de la línea negra punteada (A) corresponden al brazo C-terminal. Los residuos por encima de la línea negra punteada (B) corresponden al monómero adyacente de DBP. Las líneas rojas punteadas corresponden a las interacciones hidrofóbicas. PDB: 1ADU.

4.1.2 Interacciones por enlace de hidrógeno resueltas por LigPlot+

Además de las interacciones por enlace de hidrógeno antes descritas ([sección 1.8.2](#)), el diagrama resuelto por *LigPlot+* sugiere la formación de más enlaces de hidrógeno entre el brazo C-terminal y DBP ([Tabla 8](#)) ([Figura 15](#)). Se muestra, por ejemplo, la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo de la cadena principal de V513 y L515, con los átomos de nitrógeno de las cadenas laterales de N422 y Q231, respectivamente. Los datos sugieren que no solamente se forman interacciones por enlace de hidrógeno en la cavidad en donde se anclan los residuos P526 y F527, sino que estas interacciones también se establecen en la otra cavidad hidrofóbica.

Tabla 8

Interacciones por enlace de Hidrógeno

Residuo (A)	Residuo (B)	Panel
V513	N422	A
S514	T232	A
L515	Q231	A
V517	N478	B
Previamente descritos (sección 1.8.2)		
D521	R484	C
N525	Q384	C
P526	R484	C
F529	R496	D

Nota: (A) Residuos del brazo C-terminal. (B) Residuos con los que interactúa el brazo C-terminal.

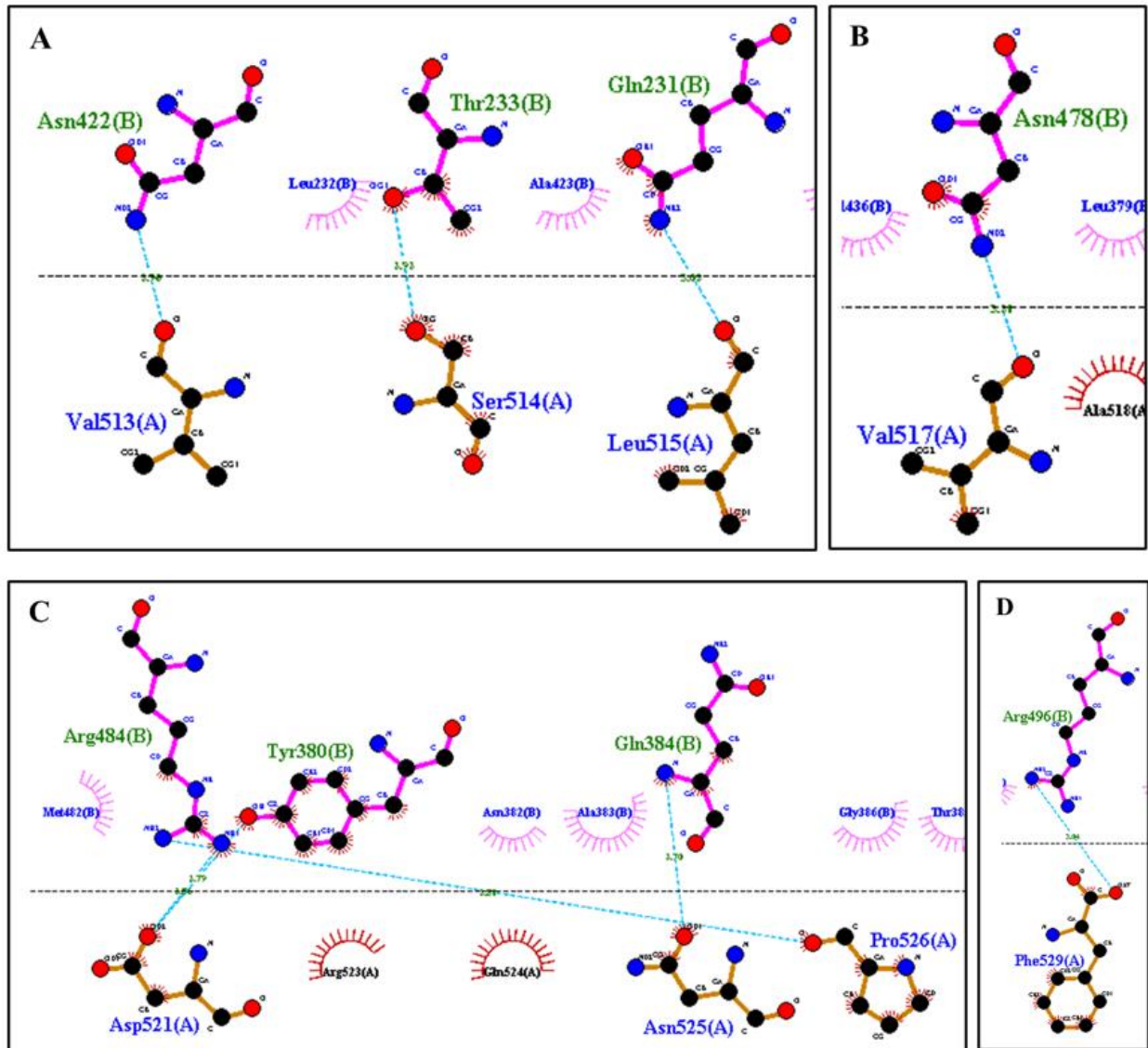


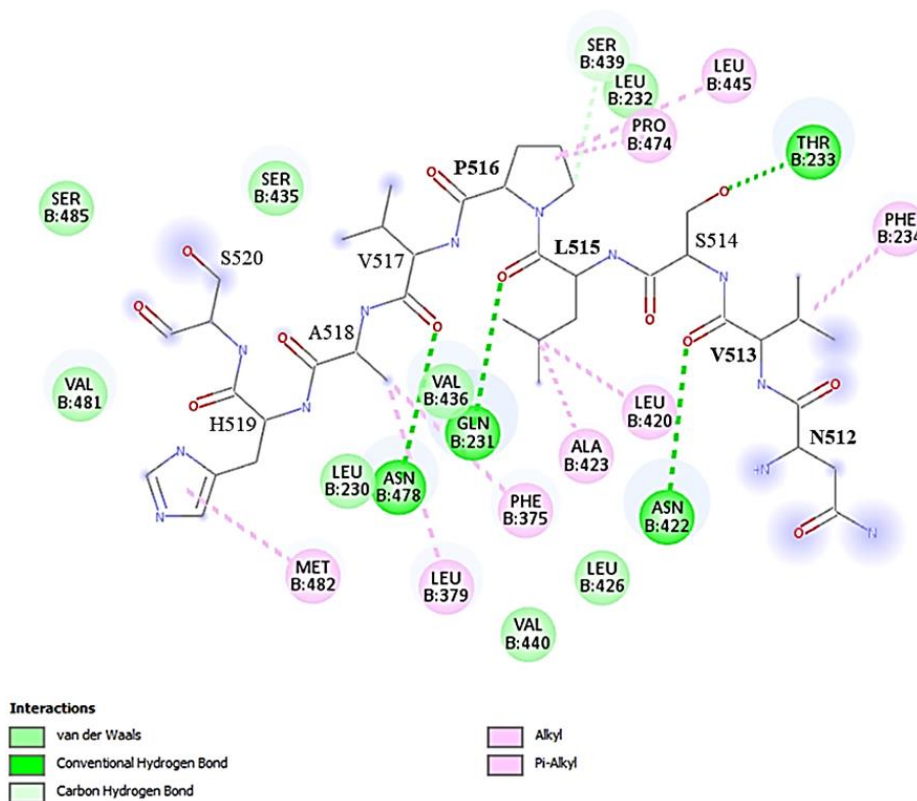
Figura 15. Diagrama en 2D de las interacciones por enlace de hidrógeno. Los residuos debajo de la línea negra punteada (A) corresponden al brazo C-terminal. Los residuos por encima de la línea negra punteada (B) corresponden al monómero adyacente de DBP. Las líneas azules punteadas corresponden a los enlaces de hidrógeno. PDB: 1ADU.

4.1.3 Interacciones resueltas por Discovery Studio.

Para contrastar las interacciones observadas en los diagramas resueltos por *LigPlot+*, se utilizó *Discovery Studio*: otro visualizador que permite identificar un mayor tipo de interacciones. Sin embargo, debido a las limitaciones del programa, para poder visualizar los diagramas de las interacciones ([Figura 16](#)) se tuvo que editar el brazo C-terminal en el complejo. Primero se visualizaron los residuos 512-520 y después los residuos 521-529 del brazo C-terminal.

Respecto a las interacciones formadas por los principales residuos implicados en la multimerización de DBP ([Tabla 9](#)), volvemos a observar la formación de enlaces de hidrógeno convencionales por parte de V513, L515 y P526, lo cual coincide con el análisis resuelto por *LigPlot+*; además, para los residuos P516 y P526 se muestra la formación de enlaces de hidrógeno con carbono, los cuales son menos energéticos que un enlace de hidrógeno convencional, pero no habían sido descritos anteriormente. Las interacciones hidrofóbicas de V513 descritas en la literatura de nuevo no aparecen, pero se muestra la formación de una interacción de tipo Pi-Alquilo entre la cadena lateral de V513 y el anillo aromático de F234. Las interacciones resueltas como tipo alquilo, Pi-alquilo o de Van der Waals, habían sido descritas en la literatura o resueltas por *LigPlot+* solamente como interacciones hidrofóbicas; la distinción es importante, debido a que las interacciones de Van der Waals se establecen de forma indirecta por proximidad entre el complejo ligando-receptor, mientras que las interacciones de tipo alquilo o Pi-alquilo se establecen concretamente entre grupos funcionales (Zhou et al., 2012).

En general, los diagramas de las interacciones resueltos por *LigPlot+* y *Discovery Studio* concuerdan entre sí y con lo descrito en la literatura; que no se hayan observado las interacciones hidrofóbicas descritas para V513 probablemente se deba a que se utilizó un cristal diferente y no necesariamente a que V513 no interactúe con estos residuos; sin embargo, debido a que el cristal utilizado por *Tucker et al.* no se encuentra en el *Protein Data Bank*, no podemos superponerlos para contrastar la vecindad de V513 (Tucker et al., 1994). También podría deberse a los límites de distancia que en *LigPlot+* y *Discovery Studio* determinan la presencia de interacciones.



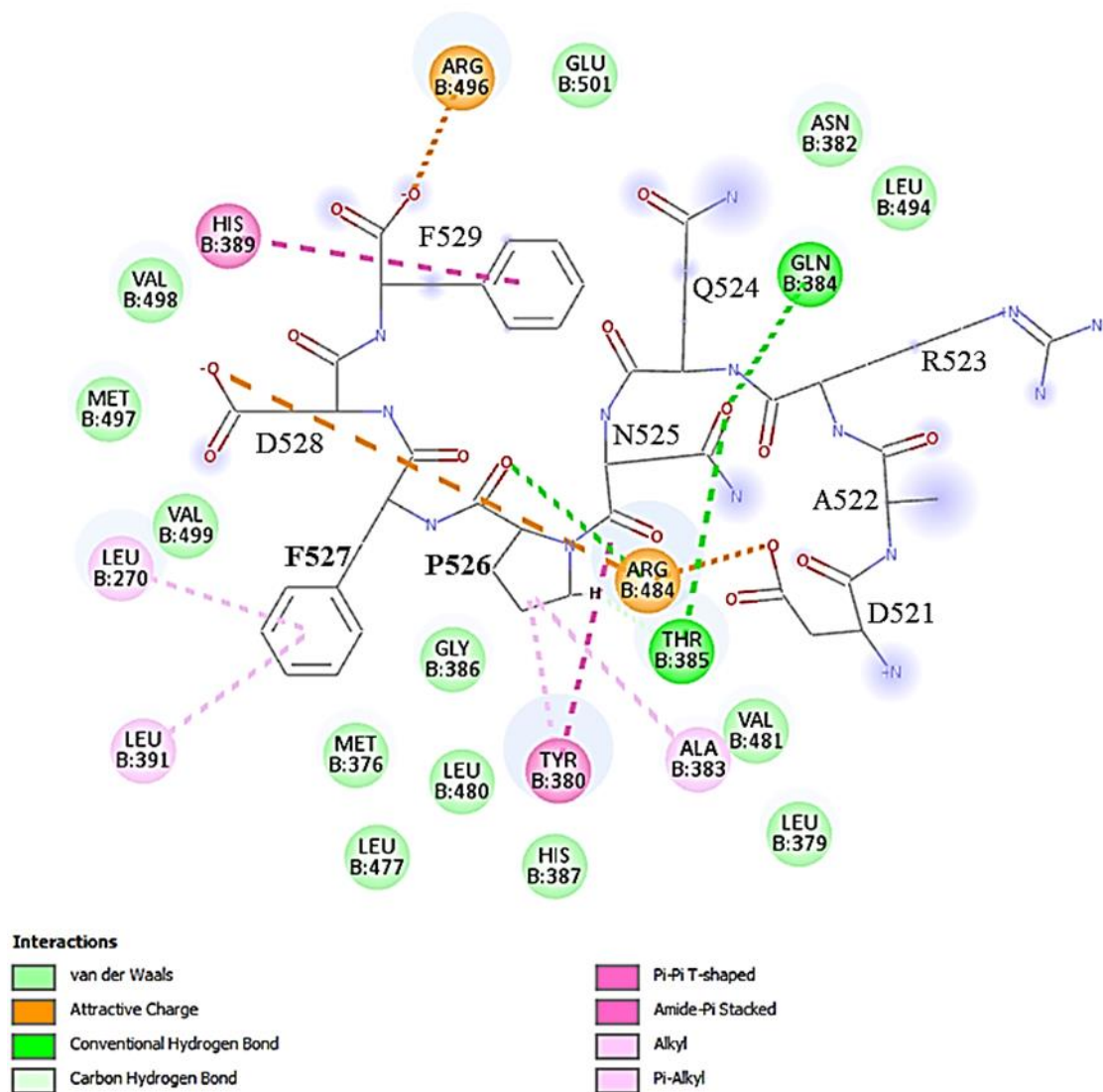


Figura 16. Diagramas en 2D de las interacciones identificadas por Discovery Studio. En el panel superior se muestran las interacciones formadas por los residuos 512-520. En el panel inferior se muestran las interacciones formadas por los residuos 521-529. El tipo de interacción y su código de color se muestran en la figura.

Tabla 9

Tipos de interacciones formadas por los principales residuos implicados en la multimerización de DBP.

Residuo (A)	Tipos de Interacciones y Residuos (B)					
	Van der Waals	Enlace de Hidrógeno Convencional	Enlace de Hidrógeno con Carbono	Alquilo	Pi-Alquilo	Apilamiento Amida-Pi
V513		N422			F234	
L515		Q231		A423 L420		
P516	L232		S439	L445 P474		
P526	G386	R484	T385	A383	Y380	Y380
F527	G386 M376 L480 V499				L270 L391	

Nota: (A) Residuos del brazo C-terminal. (B) Residuos con los que interactúa el brazo C-terminal.

24.2 Análisis del estado de conservación

Debido a que se han identificado una gran cantidad de tipos distintos de adenovirus, es importante conocer el estado de conservación del brazo C-terminal y de los residuos con los que interactúa el brazo. Para este análisis se utilizaron los tipos de adenovirus que están siendo actualmente estudiados en el grupo para seroprevalencia en México.

Los resultados del alineamiento múltiple de secuencias por *Clustal Omega* ([Figura 17](#)) muestran que los residuos N512 (región de bisagra), L515-P516 (segunda cavidad hidrofóbica) y P526-F527 (primera cavidad hidrofóbica—punta del gancho) se encuentran completamente conservados en las 13 secuencias analizadas. Como se ha descrito anteriormente ([Sección 1.8](#)), estos residuos también se encuentran completamente conservados en HAdV -7, -2 y -40. Por otro lado, V513 (región de bisagra y segunda cavidad hidrofóbica) se encuentra conservada en 12/13 secuencias; la excepción es HAdV-12, en donde se encuentra sustituida por una isoleucina; acorde a la literatura, ya se había descrito que V513 presenta sustituciones entre diferentes tipos de Adenovirus. El residuo S514 (región de bisagra) se encuentra sustituido por alaninas en 3/13 secuencias, lo cual resulta de especial interés tomando en cuenta que S514 está implicado con la capacidad del brazo C-terminal de adquirir diferentes conformaciones. En el extremo C-terminal se observa que los residuos D528 y F529, que aparentemente forman interacciones electrostáticas con R484 y R496 respectivamente, se encuentran conservados en prácticamente todas las secuencias a excepción de H41.

En la (Figura 17) también podemos observar que si eliminásemos el *gap* (o la alanina) en la posición 7 de las últimas 4 secuencias (-H5, -H6, -H36, -H26) el residuo H519 también se encontraría completamente conservado y D521 presentaría sustituciones conservativas (D = E), lo cual también coincide con lo descrito en la literatura para HAdV -7, -2 y -40; sin embargo, no hay información detallada sobre las implicaciones de estos residuos en la multimerización de DBP. De manera general, podemos distinguir que entre las posiciones 8 y 15 del péptido abundan aminoácidos polares o cargados; independientemente de que algunos se encuentran más o menos conservados entre los diferentes tipos de adenovirus (e.g. H519, R523), esto concuerda con la disposición del brazo durante la multimerización, siendo esta la región expuesta al medio.

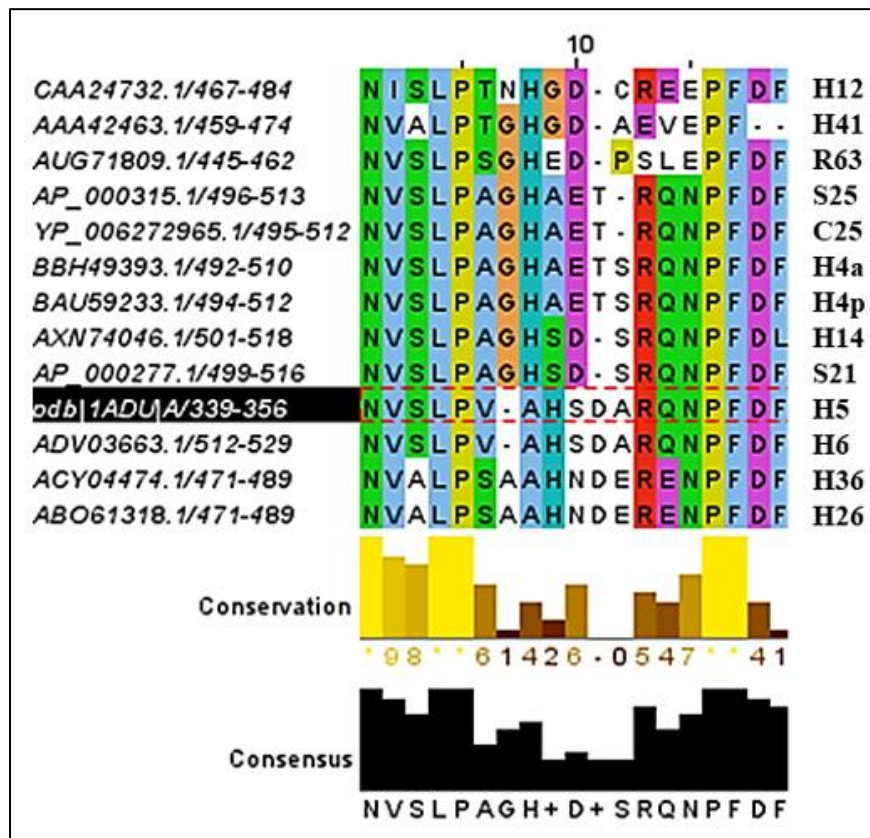


Figura 17. Alineamiento múltiple de secuencias. Se muestra el alineamiento de las 13 secuencias del brazo C-terminal. El código en el extremo del lado derecho indica la especie y el virus correspondiente: H = Human, R= Rhesus, S = Simian, C = Chimpanzee. Las gráficas debajo de las secuencias muestran a) el grado de conservación en una escala del 0 al 10 y b) el porcentaje de identidad. Visualizador de *Jalview*.

Respecto a los residuos con los que interactúan estos aminoácidos, su estado de conservación se muestra en la (Tabla 10). Observamos que el residuo N422, que forma un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de V513 en HAdV-5, se encuentra conservado en todas las secuencias a excepción de -H41, en donde se encuentra sustituido por una glicina. El residuo Q231, que forma un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de L515 en HAdV-5, no se encuentra

conservado en -H4 y virus de mono (*Rhesus*, *Simian* y *Chimpanzee*), sino que está sustituido por una prolina que no puede formar este tipo de interacciones. El aminoácido no conservado G386 se encuentra sustituido por un aspartato en 5/13 secuencias, lo cual resulta de especial interés debido a que en HAdV-5, G386 establece interacciones de Van der Waals con P526 y F527. El residuo T385 que interactúa con P526 y N525, se encuentra sustituido por diferentes aminoácidos polares o cargados positivamente (H, R, Q, S); sin embargo, debido a que la cadena lateral de T385 no interactúa con P526 o N525, que se encuentre sustituido es irrelevante. La mayoría de las sustituciones que se observan son de aminoácidos alifáticos por otros aminoácidos alifáticos. Observamos, por tanto, que el brazo C terminal y los residuos con los que interactúa se encuentran, en general, conservados.

Tabla 10

Estado de conservación de los residuos que interactúan con V513, L515, P516, P526 y F527

Residuo (A)	Residuo (B)	Estado
V513	N422	Conservado (N = G en H41)
	F234	Conservado
L515	T233	Conservado
	A423	Conservado (A = V en H12)
	L426	Conservado (L = I en H12)
	L420	Sustitución (L = M, I)
	Q231	No conservado (Q = P en monos y H4)
P516	T233	Conservado
	S439	Conservado
	P474	Conservado
	L445	Sustitución (L = V)
	F375	Conservado
	L232	Sustitución (L = I, V, M)
P526	R484	Conservado
	Y380	Conservado
	A383	Sustitución (A = M, I)
	G386	No conservado (G = D)
	T385	Sustitución (cargados + o polares)
F527	G386	No conservado (G = D)
	M376	Sustitución (M = L, V)
	L270	Sustitución (L = V)
	L391	Conservado
	V499	Sustitución (V = I)
	L480	Conservado

Nota: (A) Residuos del brazo C-terminal. (B) Residuos con los que interactúa el brazo C-terminal. Sólo se muestran los residuos resueltos por *LigPlot+* o *Discovery Studio*. En rojo se muestran los residuos no conservados.

4.3 Acoplamiento molecular de los residuos 525-529 del brazo C-terminal por AutoDock-VINA

Debido a la forma de la cavidad hidrofóbica en donde se anclan los residuos P526 y F527, se optó por seleccionar esta región como blanco biológico (Figura 18); esta cavidad la ocupan los residuos conservados N525, P526, F527, D528 y F529 (Figura 19). Respecto a los aminoácidos con los que interactúan los residuos que no han sido descritos previamente (Tablas 11 y 12), Q384 y T385, que forman enlaces de hidrógeno convencionales con la cadena lateral de N525, presentan sustituciones por aminoácidos polares o cargados positivamente; no obstante, como se mencionó anteriormente, la cadena lateral de T385 no interactúa con el brazo C-terminal, lo mismo ocurre para Q384, por lo que es irrelevante que se encuentren sustituidos en diferentes tipos de adenovirus. D528 forma una interacción electrostática con el residuo conservado R484, además de establecer interacciones de Van der Waals con otros residuos alifáticos que presentan sustituciones. F529 interactúa con H389 formando una interacción de tipo Pi-Pi en forma de T; sin embargo, en otros tipos de adenovirus esta histidina se encuentra sustituida por aminoácidos que no son capaces de formar esta interacción. F529 también establece una interacción electrostática con el residuo conservado R496 (R = K). La Figura 18 se realizó mediante UCSF ChimeraX (Pettersen et al., 2021).

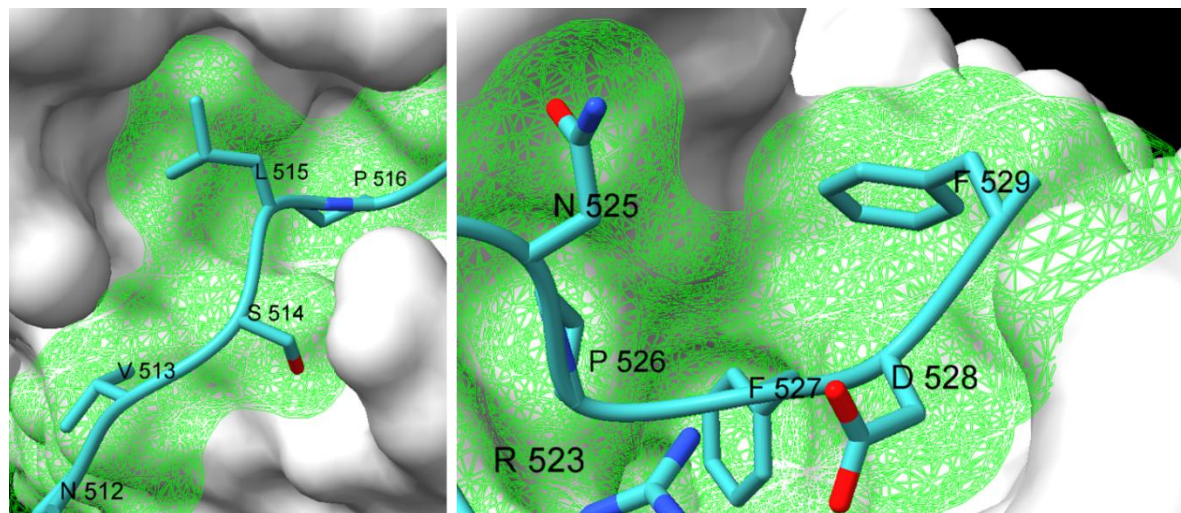


Figura 18. Forma de las cavidades hidrofóbicas en donde interactúan los residuos V513, L515, P516, P526 y F527. PDB: 1ADU. UCSF ChimeraX.

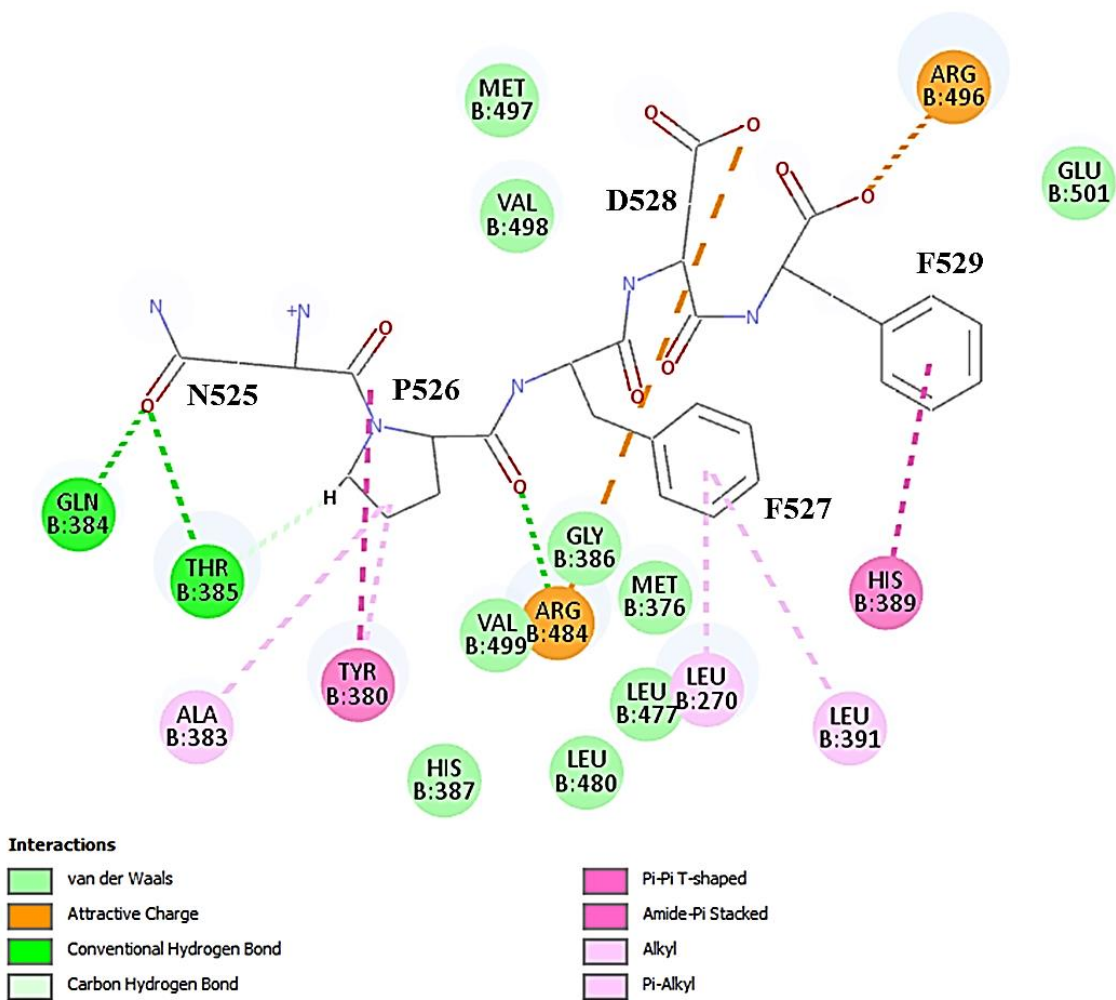


Figura 19. Diagrama de las interacciones de los residuos 525-529. El tipo de interacción y su código de color se muestran en la figura.

Tabla 11.

Tipos de interacciones formadas por N525, D528, F529.

Residuo (A)	Tipos de Interacciones y Residuos (B)			
	Van der Waals	Enlace de Hidrógeno Convencional	Pi-Pi en forma de T	Electrostática
N525		Q384 T385		
D528	M497 V498			R484
F529	E501		H389	R496

Nota: (A) Residuos del brazo C-terminal. (B) Residuos con los que interactúa el brazo C-terminal.

Tabla 12.

Estado de conservación de los residuos que interactúan con N525, D528, F529.

Residuo (A)	Residuo (B)	Estado
N525	Q384	Sustitución (cargados + o polares)
	T385	Sustitución (cargados + o polares)
D528	R484	Conservado
	M497	Sustitución (M = L)
	V498	Sustitución (V = L, I)
F529	H389	Sustitución (cargados + o polares)
	R496	Sustitución (R = K)
	E501	Conservado

Nota: (A) Residuos del brazo C-terminal. (B) Residuos con los que interactúa el brazo C-terminal. Sólo se muestran los residuos resueltos por *LigPlot+* o *Discovery Studio*.

4.3.1 Acoplamiento de los residuos 525-529

El acoplamiento molecular para evaluar la energía de afinidad y la forma en que se acoplan los residuos 525-529 en la cavidad se llevó a cabo cinco veces, i.e. se resolvieron un total de 45 poses con 5 semillas aleatorias distintas. Se utilizó el cristal 2WB0 debido a que presenta la mejor resolución (1.95Å). En la (Tabla 13) se muestra la energía de afinidad determinada para cada una de las poses resueltas.

$$\text{En donde: } -7.8 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.7 \text{ kcal/mol}$$

Tabla 13

Energía de afinidad—Péptido WT

Pose	Energía (kcal/mol)				
	WT (seed: -1369358696)	WT_2 (seed: -1796718288)	WT_3 (seed: -588397712)	WT_4 (seed: -1748022120)	WT_5 (seed: -795822744)
1	-7.6	-7.6	-7.4	-7.6	-7.8
2	-7.4	-7.5	-7.4	-7.3	-7.6
3	-7.4	-7.3	-7.3	-7.3	-7.5
4	-7.4	-7.3	-7.3	-7.3	-7.4
5	-7.4	-7.3	-7.2	-7.2	-7.3
6	-7.3	-7.2	-7.2	-7.2	-7.3
7	-7.3	-7.2	-6.9	-7.2	-7.3
8	-7.3	-7.1	-6.7	-7.1	-7.2
9	-7.1	-6.8	-6.7	-7.1	-7.1

Nota: WT = Wild Type = residuos presentes en la secuencia del brazo C-terminal de HAdV-5. En negritas se resaltan las poses 7 y 30. La tonalidad de los colores verde es para facilitar la visualización del intervalo de energía de las poses.

Resulta de especial interés hacer notar que dos de las poses (7 y 30) han acoplado los residuos de manera similar a lo que se observa en el cristal 1ADU ([Figura 20](#)). Ambas presentan una energía de afinidad igual a -7.3 kcal/mol, en donde la principal diferencia entre las poses es la orientación de la cadena lateral de N525. Respecto a las interacciones ([Figura 21](#)), en el acoplamiento por *AutoDock-VINA* observamos la formación de hasta cuatro enlaces de hidrógeno: 1) entre la cadena lateral de N525 y el grupo amino de la cadena principal de Q384 o T385; 2) entre el grupo carbonilo de la cadena principal de P526 y la cadena lateral de R484; 3) entre la cadena lateral de D528 y el grupo amino de la cadena principal de M497; y 4) entre el grupo carboxilo de F529 y la cadena lateral de R496. En contraste con el análisis previo de las interacciones, D528 interactúa con M497 en vez de R484. Si observamos la orientación de la cadena lateral de D528 en el cristal vs el acoplamiento ([Figura 20](#)), podemos notar por qué D528 no interactúa con R484; esto podría estar relacionado con que en el brazo C-terminal completo, D528 también interactúa intramolecularmente con R523. Además de las interacciones por enlace de hidrógeno, se observan múltiples contactos hidrofóbicos ([Tabla 14](#)); cabe recalcar que el visualizador de las interacciones intermoleculares de *AutoDock-Tools* no permite identificar tantos tipos de interacciones como *Discovery Studio*.

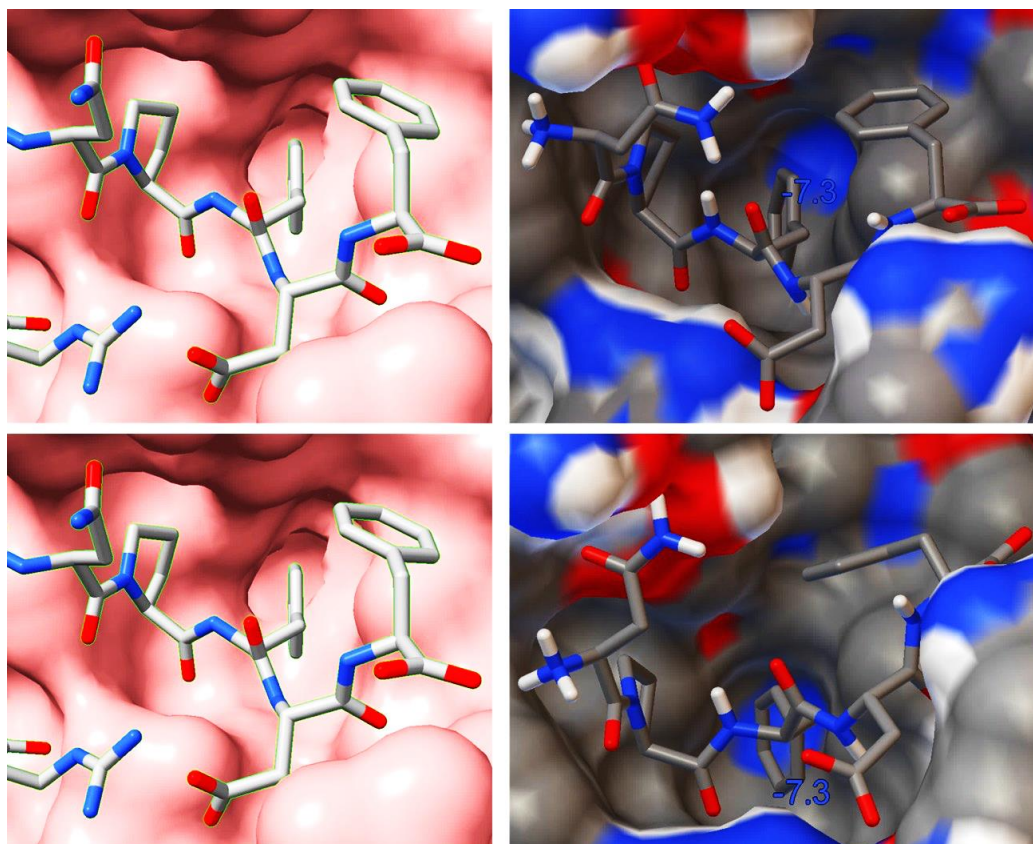


Figura 20. Posicionamiento de los residuos en el cristal vs Acoplamiento por AutoDock-Vina. En las figuras del lado izquierdo se muestra el posicionamiento que observamos en el cristal 1ADU. En el lado superior derecho se muestra la pose 7 y debajo la pose 30; se muestra también la energía de afinidad en kcal/mol. Las imágenes del lado izquierdo se realizaron mediante UCSF ChimeraX y las del lado derecho mediante Autodock-Tools.

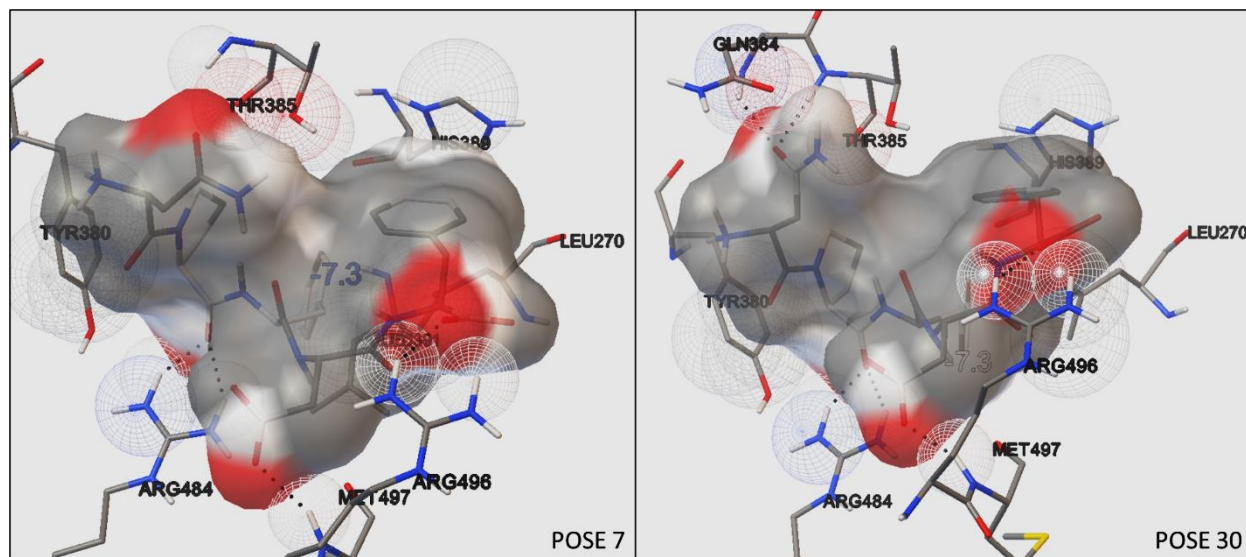


Figura 21. Interacciones formadas por las poses 7 y 30. Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. La principal diferencia es en la orientación de la cadena lateral de N525, lo que resulta en la formación de enlaces de hidrógeno con Q384 o T385. Energías de afinidad = -7.3 kcal/mol. Las imágenes se realizaron mediante Autodock-Tools.

Tabla 14

Principales interacciones hidrofóbicas resueltas para las poses 7 y 30

Interacciones Hidrofóbicas		
Ligando	Receptor	# Contactos
P526	Y380	4
F527	L270	2
	L391	1
F529	H389	1

Acorde a la literatura, los principales residuos implicados en la multimerización son P526 y F527 (*punta del gancho*). En el 31.31% de los casos (14/45 poses) estos residuos se acoplaron de manera similar al cristal, presentando un intervalo de $-7.6 \leq$ energía de afinidad ≤ -7.1 kcal/mol. Además de reproducir el posicionamiento de los cinco residuos en el cristal, se presentaron 2 casos

principales ([Figuras 22 y 24](#)): *a-1*) La orientación de los residuos D528 y F529 cambia, y *b-1*) Además del cambio en la orientación de los residuos D528 y F529, el grupo carboxilo de F529 se posiciona fuera de la cavidad en una región polar adyacente.

Respecto a las interacciones, en el *caso a-1* el cambio en la orientación de los residuos D528 y F529 resulta en la disrupción de sus enlaces de hidrógeno antes descritos; este cambio en la orientación también puede resultar en que el grupo carbonilo de la cadena principal de P526 ya no pueda interactuar con R484. Observamos también que el posicionamiento de N525 determinará los enlaces de hidrógeno que su cadena lateral puede formar; no solamente con los grupos amino de la cadena principal de Q384 y T385, también con la cadena lateral de T385; sin embargo, el grupo hidroxilo no es tan buen aceptor de enlace de hidrógeno como sí lo es actuando como donador; lo cual puede ocurrir si, por ejemplo, el grupo carbonilo de la cadena principal de D528 se posiciona lo suficientemente cerca. Esto ocurre en el caso de mayor energía de afinidad (-7.5kcal/mol), en donde los enlaces de hidrógeno con R484 y T385 se mantienen, y la pérdida de los enlaces de hidrógeno formados por D528 y F529 no afectan la energía de afinidad ([Figura 23](#)).

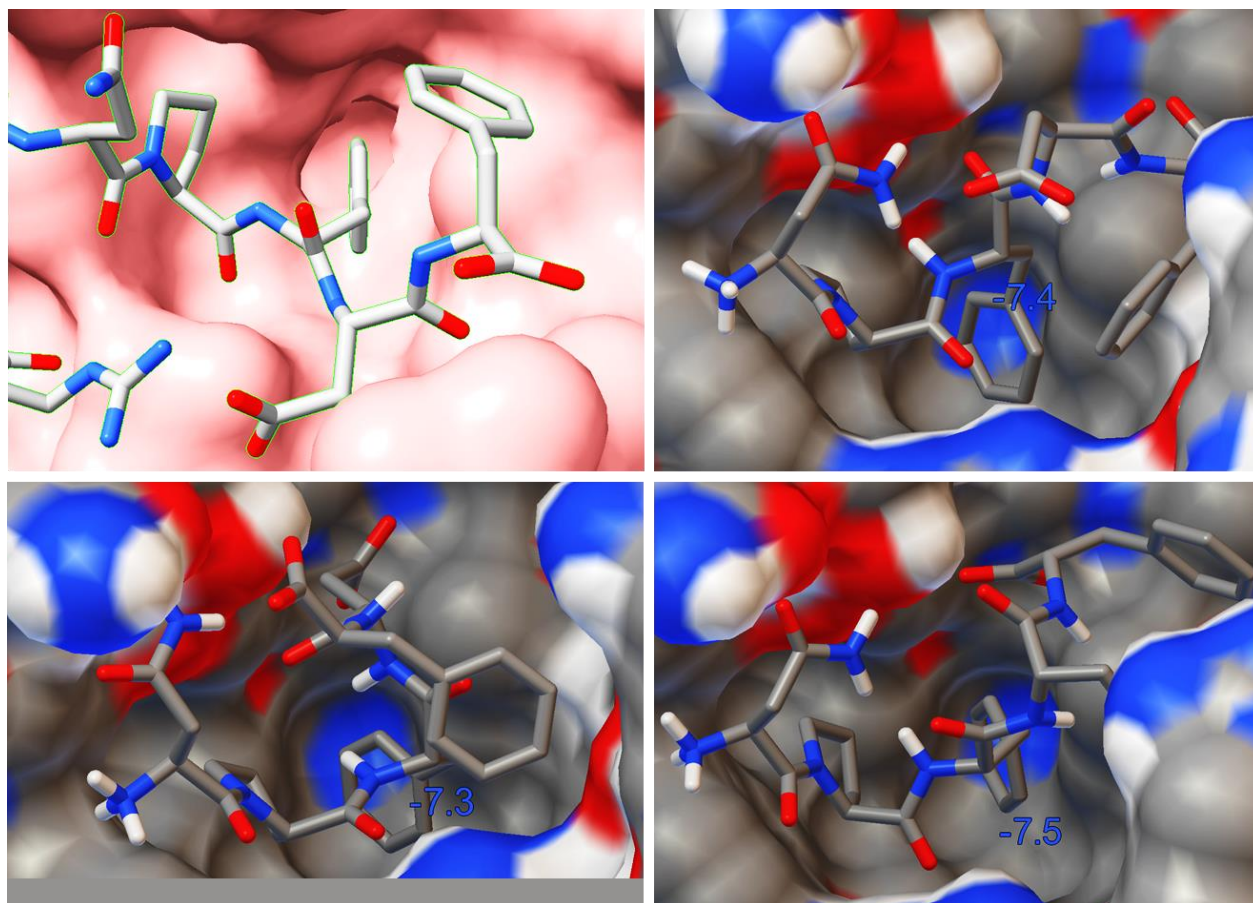


Figura 22. *Caso a-1—Cambio en la orientación de los residuos D528 y F529.* Se muestran diferentes poses (3, 42, 11) en donde la principal diferencia es la orientación de los residuos D528 y F529. Como referencia, en la imagen del extremo superior-izquierdo se muestra el posicionamiento de los residuos en el cristal 1ADU.

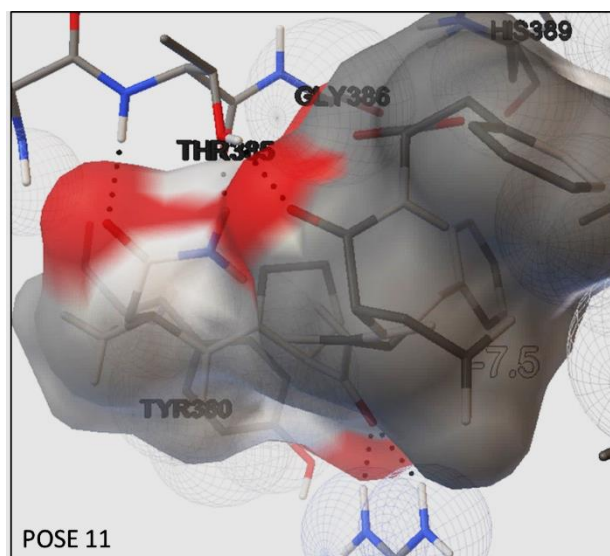


Figura 23. *Caso a-1—Pose 11.* Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. La principal diferencia entre las poses es en la orientación de los residuos D528 y F529. En este ejemplo se muestra que, si un grupo aceptor de enlace de hidrógeno se posiciona cerca del grupo hidroxilo de T385, puede establecerse la formación de otro enlace de hidrógeno. Energía de afinidad = -7.5 kcal/mol.

Por otro lado, se observó que los residuos P526 y F527 pueden posicionarse en la cavidad hidrofóbica de tal manera que establecen un mayor número de contactos con otros residuos ([Tabla 15](#)), lo cual concuerda con la literatura y los análisis previos sobre las interacciones. A su vez, el cambio en la orientación de D528 y F529 puede resultar en la formación de interacciones hidrofóbicas con otros residuos como V498, V499 o E501; también descritos anteriormente.

Tabla 15

Interacciones de P526 y F527

Interacciones Hidrofóbicas		
Ligando	Receptor	# Contactos
P526	Y380	4-5
F527	L270	2-3
	L391	1
	L480	1
	M376	1

En el *caso b-1*, el posicionamiento del grupo carboxilo de F529 resulta en la formación de enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo de Y251 y a veces con el grupo amino de la cadena principal de M497 ([Figura 25](#)). Aparentemente, los enlaces de hidrógeno formados con el grupo carboxilo de F529 pueden sustituir —en cuestiones de energía— a tres de los cuatro tipos de enlace

que observamos en un principio. El posicionamiento de F529 puede resultar, además, en la formación de interacciones hidrofóbicas con otros residuos, dependiendo de su orientación.

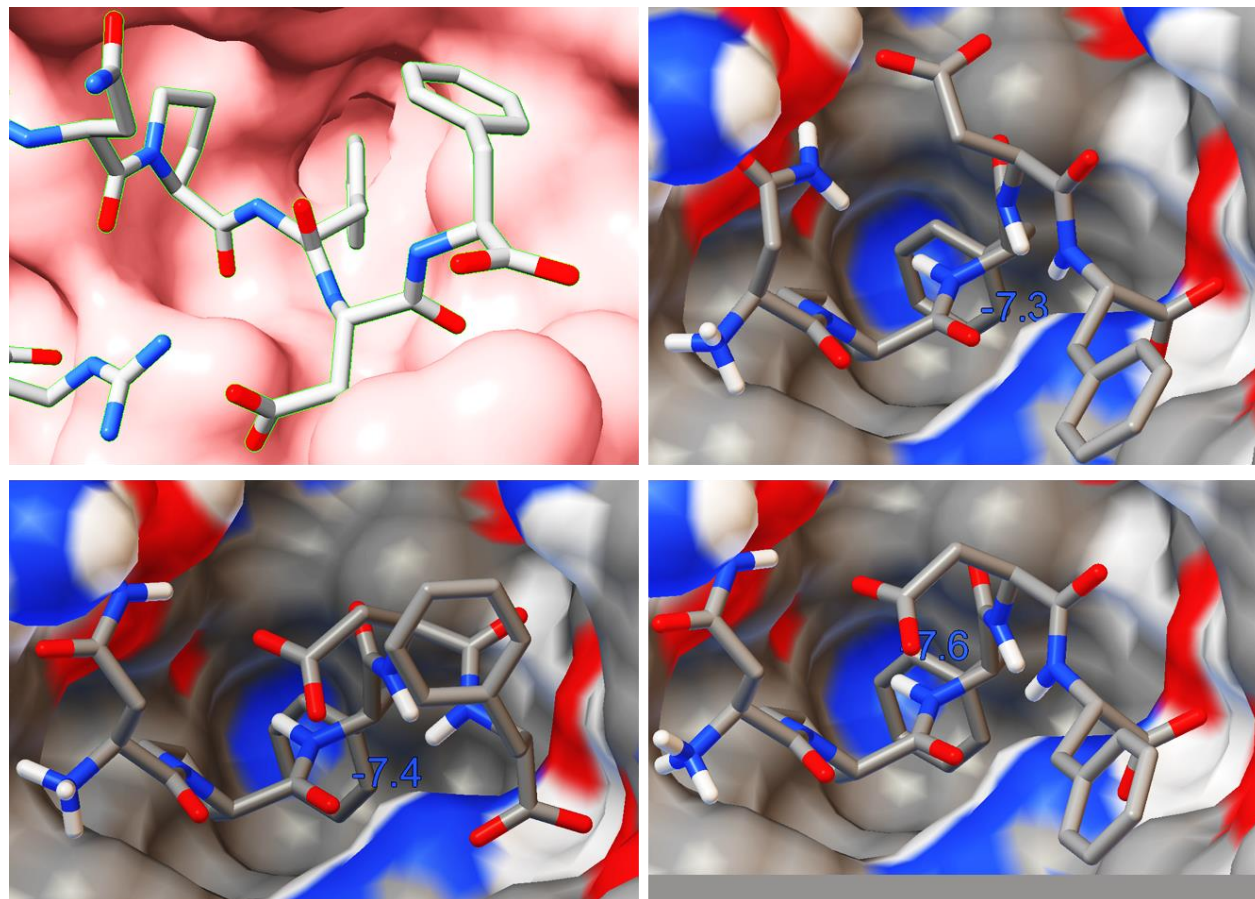


Figura 24. *Caso b-1—Posicionamiento del grupo carboxilo de F529 fuera de la cavidad.* Se muestran diferentes poses (13, 40, 1) en donde, además de observarse un cambio en la orientación de D528 y F529, la característica principal es el posicionamiento del grupo carboxilo de F529 fuera de la cavidad. Como referencia, en la imagen del extremo superior-izquierdo se muestra el posicionamiento de los residuos en el cristal 1ADU.

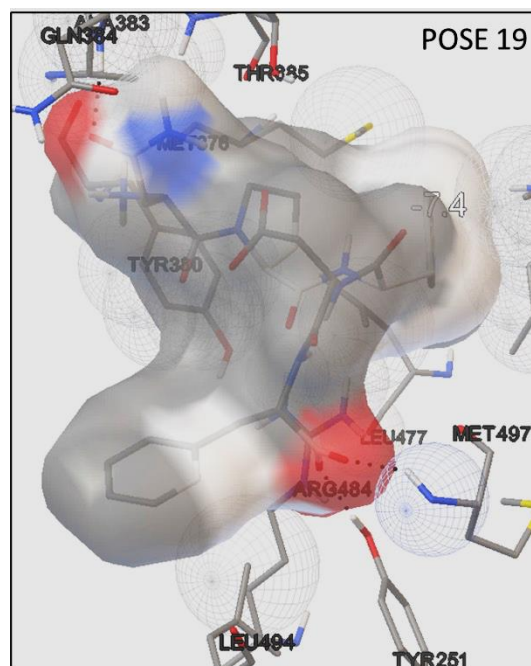


Figura 25. *Caso b—Pose 19.* Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. La principal diferencia es la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo de F529 y los residuos Y251 y M497. Energía de afinidad = -7.4kcal/mol.

Tomando en cuenta ambos casos, no es posible inferir la importancia de la orientación de los residuos D528 y F529. No obstante, también se observó que en el 40% de los casos (18/45 poses), son los grupos fenilo quienes se encuentran ocupando la cavidad hidrofóbica ([Figuras 26 y 27](#)), con un intervalo de $-7.8 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.7$ kcal/mol. Se presentaron dos casos principales: *a-2*) El sentido del péptido está invertido (FDFPN) y la orientación de los residuos N525 y P526 cambia, o *b-2*) El sentido del péptido no está invertido (NPFDF), pero F529 ocupa el lugar de F527 y los residuos N525 y P526 se posicionan fuera de la cavidad en una región polar adyacente. Acoplarse en sentido contrario no es posible para el brazo C-terminal.

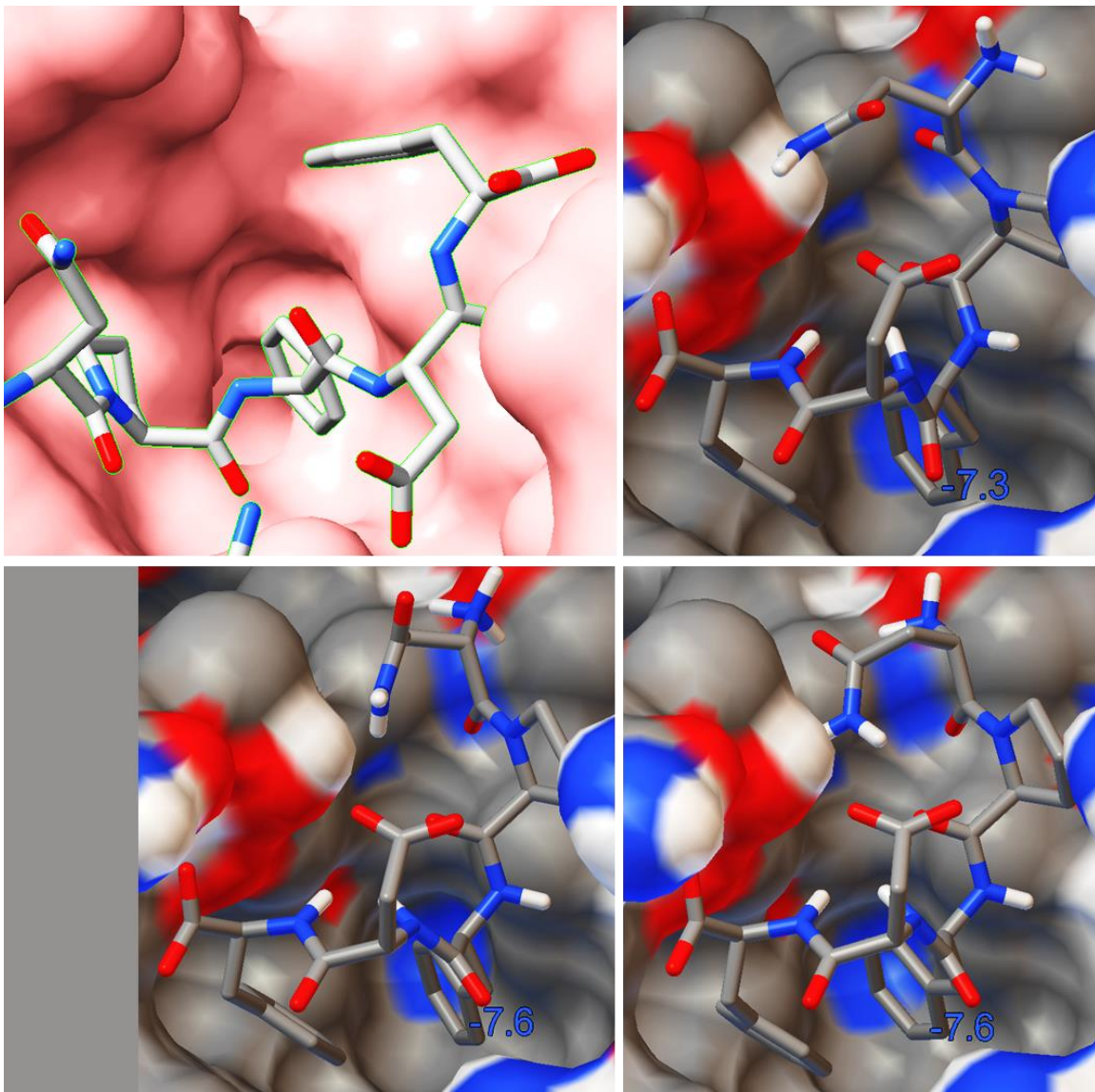


Figura 26. Caso *a-2*—Posicionamiento invertido (*FDFPN*) y cambio en la orientación de *N525* y *P526*. Se muestran diferentes poses (31, 38, 28), en donde las características principales son que el péptido se ha acoplado en sentido contrario y la orientación de los residuos *N525* y *P526* cambia. Como referencia, en la imagen del extremo superior-izquierdo se muestra el posicionamiento de los residuos en el cristal 1ADU.

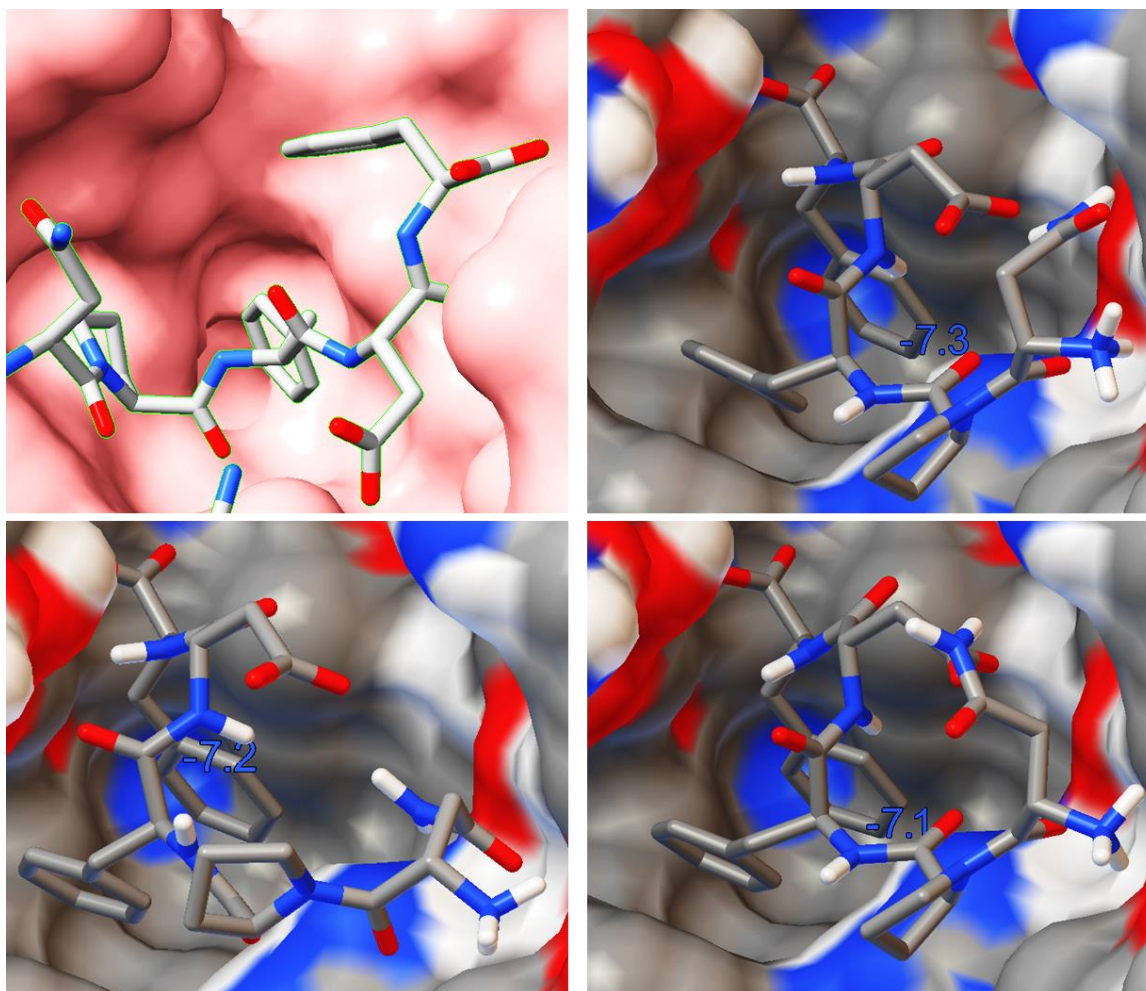


Figura 27. Caso b-2—Posicionamiento no-invertido (NPFDF) y cambio en el posicionamiento de N525 y P526. Se muestran diferentes poses (41, 23, 17), en donde las características principales son que F529 ocupa la posición de F527 y los residuos N525 y P526 se posicionan fuera de la cavidad en una región polar adyacente. Como referencia, en la imagen del extremo superior-izquierdo se muestra el posicionamiento de los residuos en el cristal 1ADU.

Respecto a las interacciones, cuando el péptido se acopla en sentido contrario, 1) F529 forma una interacción de tipo apilamiento π - π con Y380 y 2) el grupo carboxilo de F529 suele establecer el enlace de hidrógeno que formaba la cadena lateral de N525 con T385 (Figura 28). Respecto a las interacciones hidrofóbicas (Tabla 16), el número de contactos en la posición de F527 disminuye como consecuencia del posicionamiento de F529 en la región que ocupaba P526. Cuando el péptido no está invertido (caso b-2), no suele observarse la formación de enlaces de hidrógeno y es F527 quien forma el apilamiento π - π con Y380. De nuevo, la energía de afinidad no se ve afectada por la disrupción de los enlaces de hidrógeno con R484, M496 y R486.

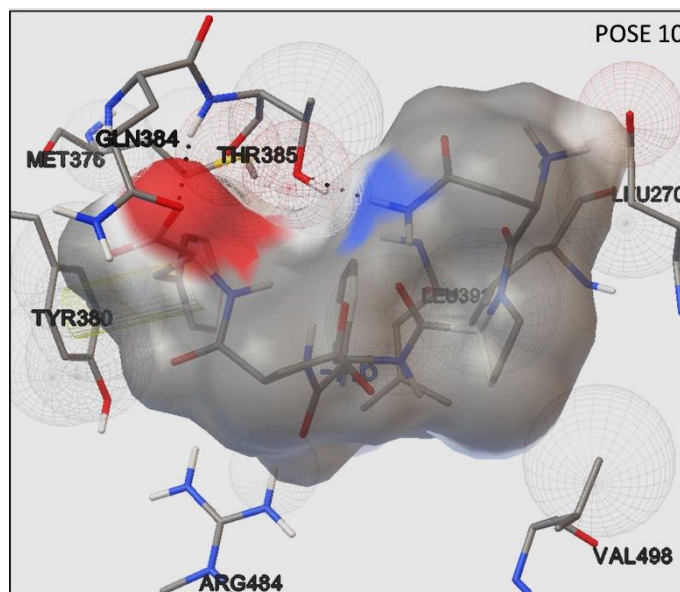


Figura 28. *Péptido Invertido—caso a-2.* Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. Las principales características son que el péptido se ha acoplado en sentido contrario y se ha establecido un apilamiento π - π ; esta interacción está representada como un cilindro amarillo. Energía de afinidad = -7.6kcal/mol.

Tabla 16

Principales interacciones hidrofóbicas

Interacciones Hidrofóbicas		
Ligando	Receptor	# Contactos
F529	Y380	4
	M376	1
F527	L270	1-2
	L391	1
P526	V498	1
N525	E501	1-2

Nota: El sentido del péptido se encuentra invertido (FDFPN)

El acoplamiento con la mayor energía de afinidad (-7.8 kcal/mol) ([Figura 29](#)) ocurre cuando el péptido está invertido y F529 está formando el apilamiento tipo π - π . En este caso ([Figura 30](#)) no se observa la formación “explícita” de ningún enlace de hidrógeno, pero 1) el carboxilo de F529 se posiciona de manera similar a la cadena lateral de N525 en el cristal y 2) el carbonilo de la cadena principal de F527 se posiciona de manera similar al carbonilo de P526 en el cristal; además, la prolina se encuentra en una conformación similar a la que se observa en el cristal para F529, lo que resulta en que P526 interactúe con H389 y que N525 pueda establecer hasta tres contactos con V498.

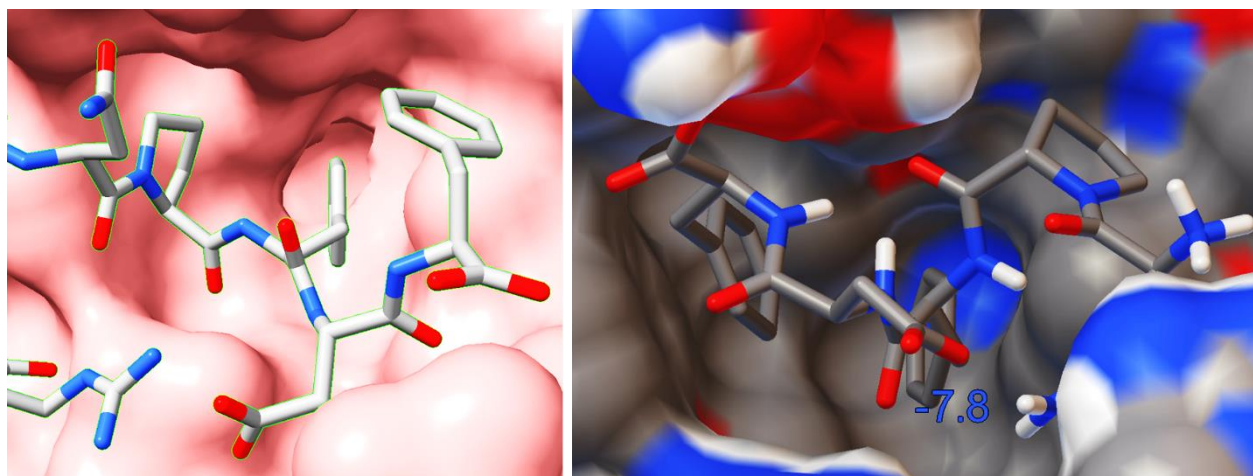


Figura 29. *Acoplamiento de mayor energía—WT.* En la figura del lado izquierdo se muestra el posicionamiento que observamos en el cristal 1ADU. En la figura del lado derecho se muestra la pose 37, en donde se observa que el péptido se ha posicionado de forma invertida, con F529 ocupando la posición de P526. En este caso, además, P526 se posiciona de manera similar a F529 en el cristal.

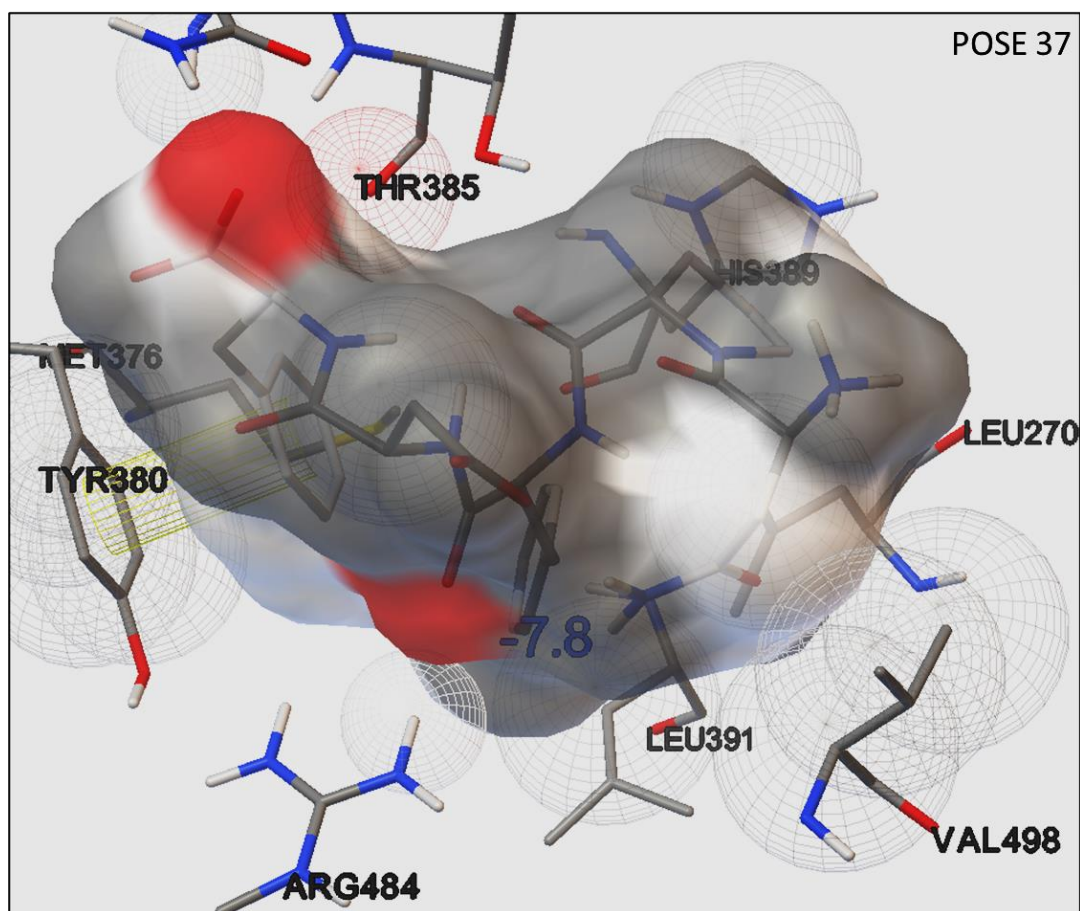


Figura 30. *Acoplamiento de mayor energía—WT.* Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. Las principales características son que el péptido se ha acoplado en sentido contrario y se ha establecido un apilamiento π - π ; esta interacción está representada como un cilindro amarillo. Energía de afinidad = -7.8kcal/mol.

Para el resto de las poses (28.88%), en donde ninguno de los casos anteriores sucede, se presentan 3 casos principales: a) Sólo F527 se encuentra en su posición, pero el sentido del péptido está invertido; P526 se posiciona de manera similar a F529 y F529 se posiciona en una depresión que suele ocupar la cadena principal del péptido (5/45 poses). b) El sentido del péptido está invertido, F527 ocupa la posición de P526, la cadena lateral de N525 interactúa con una región polar dentro de la cavidad y F529 se posiciona en una depresión que suele ocupar la cadena principal del péptido (2/45 poses). c) Ningún anillo se encuentra en su posición (4/45 poses). Respecto a estas poses, observamos distintas combinaciones del mismo tipo de interacciones ya descritas.

En conclusión, el acoplamiento molecular del péptido WT permitió identificar 1) dos regiones en donde suelen establecerse enlaces de hidrógeno (Q384/T385 y R484/Y251/M497), 2) la importancia de ocupar completamente la cavidad hidrofóbica (~70% de los casos) y 3) la posibilidad de establecer un acoplamiento de tipo π - π en la posición de P526 si es que un grupo aromático se localiza allí.

4.4 Alanine Scanning de los residuos 525-529 por AutoDock-Vina

Posteriormente se llevó a cabo un *alanine scanning* de cada uno de los residuos, para determinar su aportación a la energía de afinidad observada en el péptido WT.

4.4.1 N525A

En la (Tabla 17) se muestra la energía de afinidad determinada para cada una de las poses resueltas cuando se sustituye el aminoácido N525 por una alanina.

$$\text{En donde: } -7.8 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.6 \text{ kcal/mol}$$

Tabla 17

Energía de Afinidad N525A

Pose	Energía (kcal/mol)				
	N525A (seed: -267865584)	N525A_2 (seed: 88030344)	N525A_3 (seed: -559350904)	N525A_4 (seed: 1639819136)	N525A_5 (seed: 1707221328)
1	-7.3	-7.8	-7.8	-7.3	-7.2
2	-7.3	-7.6	-7.3	-7.0	-7.1
3	-7.3	-7.2	-7.3	-6.9	-7.0
4	-7.0	-7.1	-7.3	-6.8	-6.7
5	-7.0	-7.1	-7.2	-6.8	-6.7
6	-6.8	-7.0	-7.1	-6.8	-6.7
7	-6.8	-6.9	-7.1	-6.8	-6.7
8	-6.7	-6.9	-7.1	-6.7	-6.6
9	-6.7	-6.8	-7.1	-6.6	-6.6

Nota: En negritas se resaltan las poses de mayor energía (10 y 19). La tonalidad de los colores verde es para facilitar la visualización del intervalo de energía de las poses.

El acoplamiento del péptido WT no fue suficiente para determinar la importancia de N525, especialmente la de su cadena lateral como aceptora de enlace de hidrógeno. En este análisis, se observó que en el 60% de los casos (27/45 poses) los grupos fenilo se encuentran ocupando la cavidad y que tan solo en el 17.77% de los casos (8/45 poses) son P526 y F527 los residuos que la ocupan (como ocurre en la naturaleza). Cuando P526 y F527 ocupan la cavidad, la afinidad ($-7.1 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.6 \text{ kcal/mol}$) es menor, lo cual denota la importancia de un grupo aceptor de enlace de hidrógeno en la región de Q384/T385.

Los acoplamientos de mayor energía de afinidad (Figura 31) ocurren cuando el péptido se encuentra invertido, con F529 formando el apilamiento π - π y su grupo carboxilo actuando como aceptor de enlace de hidrógeno de Q384 o Q384 y T385 (de manera análoga a la cadena lateral de N525). F527 se encuentra en su misma posición, ocupando el resto de la cavidad. Esto sugiere que 1) un grupo aceptor de enlace de hidrógeno en la región de Q384/T385 es importante para el acoplamiento y 2) se puede prescindir de la región compuesta por los residuos R484/Y251/M497.

Cuando contrastamos estos resultados con la pose de mayor energía del péptido WT (Figura 32), observamos que las interacciones de F529 y F527 se mantienen y que la principal diferencia es la orientación del aspartato y la prolina, pero que esto no parece tener efecto en la energía de afinidad.

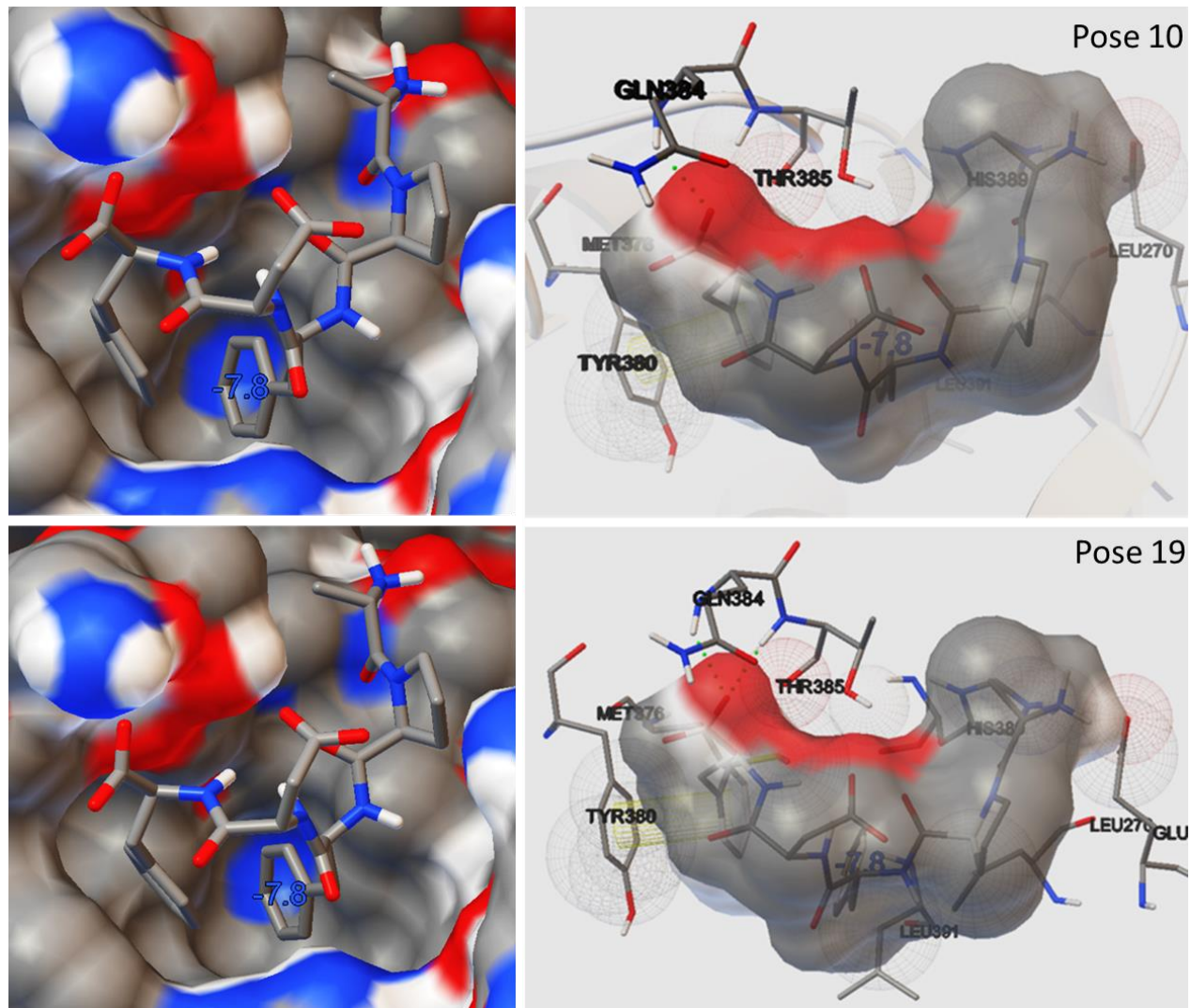


Figura 31. Acoplamiento de mayor energía—N525A. Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. El apilamiento π - π se muestra como un cilindro amarillo. P526 interactúa con E501 y A525 con H389. Energía de afinidad = -7.8 kcal/mol.

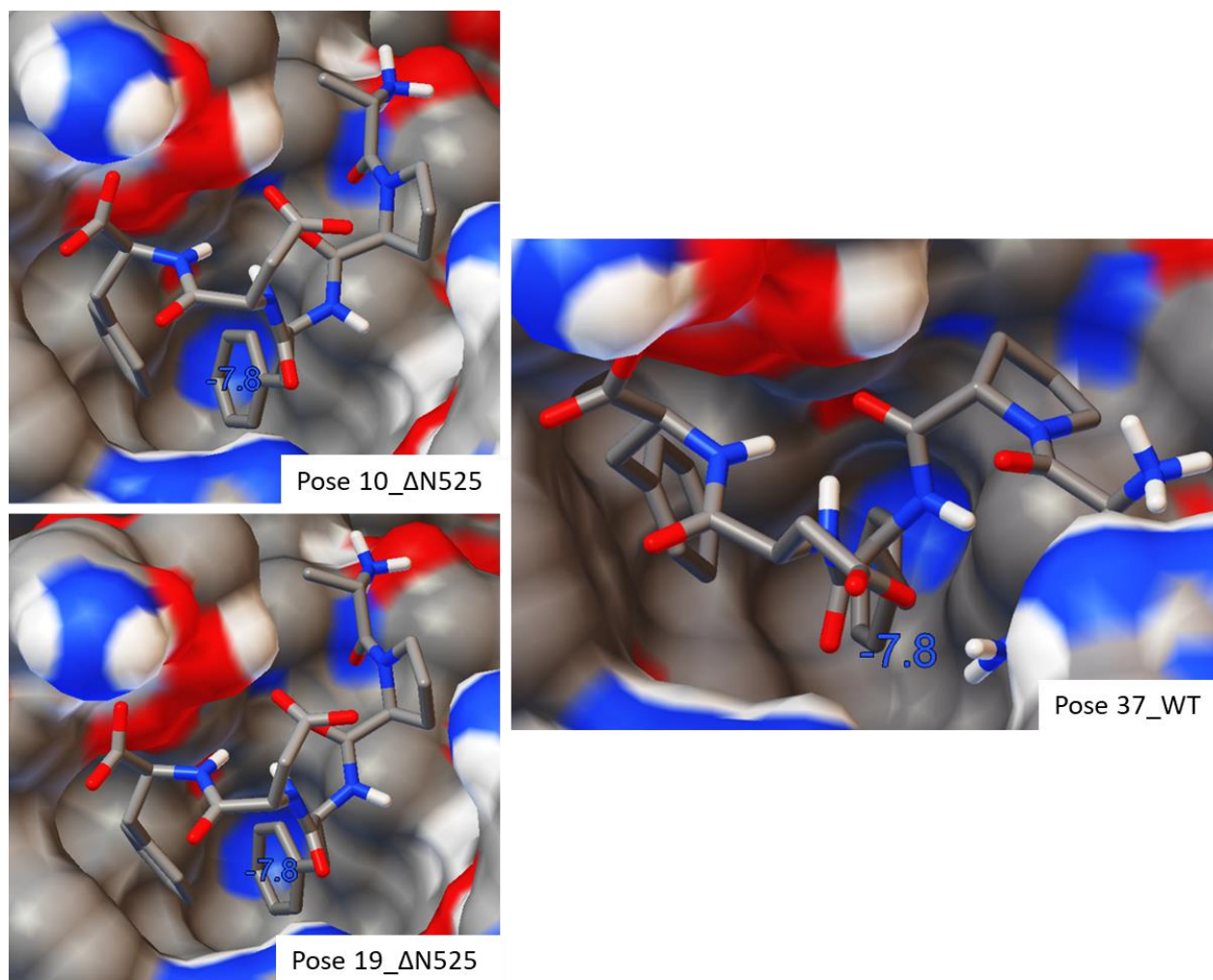


Figura 32. Poses de mayor energía N525A vs WT. Energía de afinidad = -7.8kcal/mol. El posicionamiento de D528 y P526 no tiene efecto en la energía de afinidad.

4.4.2 P526A

Hasta el momento no queda clara la relevancia de P526, pues hemos observado que puede ser sustituida por los grupos fenilo y que no parece tener efecto en la actividad cuando el péptido se ha invertido. En la (Tabla 18) se muestra la energía de afinidad determinada para cada una de las poses resueltas cuando se sustituye el aminoácido P526 por una alanina.

$$\text{En donde: } -7.1 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.3 \text{ kcal/mol}$$

Tabla 18

Energía de Afinidad P526A

Pose	Energía (kcal/mol)				
	P526A (seed: 411733608)	P526A_2 (seed: 1079081676)	P526A_3 (seed: -1850638784)	P526A_4 (seed: -777373712)	P526A_5 (seed: 332001976)
1	-7.1	-6.9	-7.1	-6.9	-6.7
2	-7.0	-6.6	-6.9	-6.6	-6.7
3	-7.0	-6.6	-6.8	-6.5	-6.7
4	-6.8	-6.5	-6.7	-6.5	-6.6
5	-6.7	-6.5	-6.7	-6.4	-6.6
6	-6.7	-6.4	-6.6	-6.4	-6.5
7	-6.6	-6.4	-6.6	-6.4	-6.4
8	-6.5	-6.3	-6.5	-6.4	-6.3
9	-6.5	-6.3	-6.4	-6.3	-6.3

Nota: La tonalidad de los colores verde es para facilitar la visualización del intervalo de energía de las poses.

La afinidad ($-7.1 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.3 \text{ kcal/mol}$) ha disminuido más que al sustituir a N525 por una alanina. Aunque sabemos que esto podría estar relacionado con que el carboxilo de F529 sustituyó a la cadena lateral de N525, lo que en realidad sugieren estos datos es que P526 sí juega un rol particular en el acoplamiento. Lo que ocurre es que, aunado a la cantidad de interacciones que la prolina puede establecer, la rigidez y el tamaño de P526 limitaba las conformaciones que el péptido podía adoptar, lo que resultaba en una mayor tasa de acoplamientos similares a 10-N525A, 19-N525A y 37-WT (de mayor energía). De hecho, los acoplamientos de mayor energía (Figura 33) en general ocurren cuando el péptido se ha acoplado de manera similar a las poses recién mencionadas. No obstante, si las propiedades anteriormente discutidas sobre N525, F527 y F529, fuesen realmente suficientes para satisfacer el acoplamiento energéticamente, debimos haber observado que la energía de afinidad de las poses 1-P526A, 3-P526A y 19-P526A fuese por lo menos similar, lo cual no ocurre. La disminución en la energía de afinidad se debe a que hay un menor número de carbonos y, por tanto, de contactos.

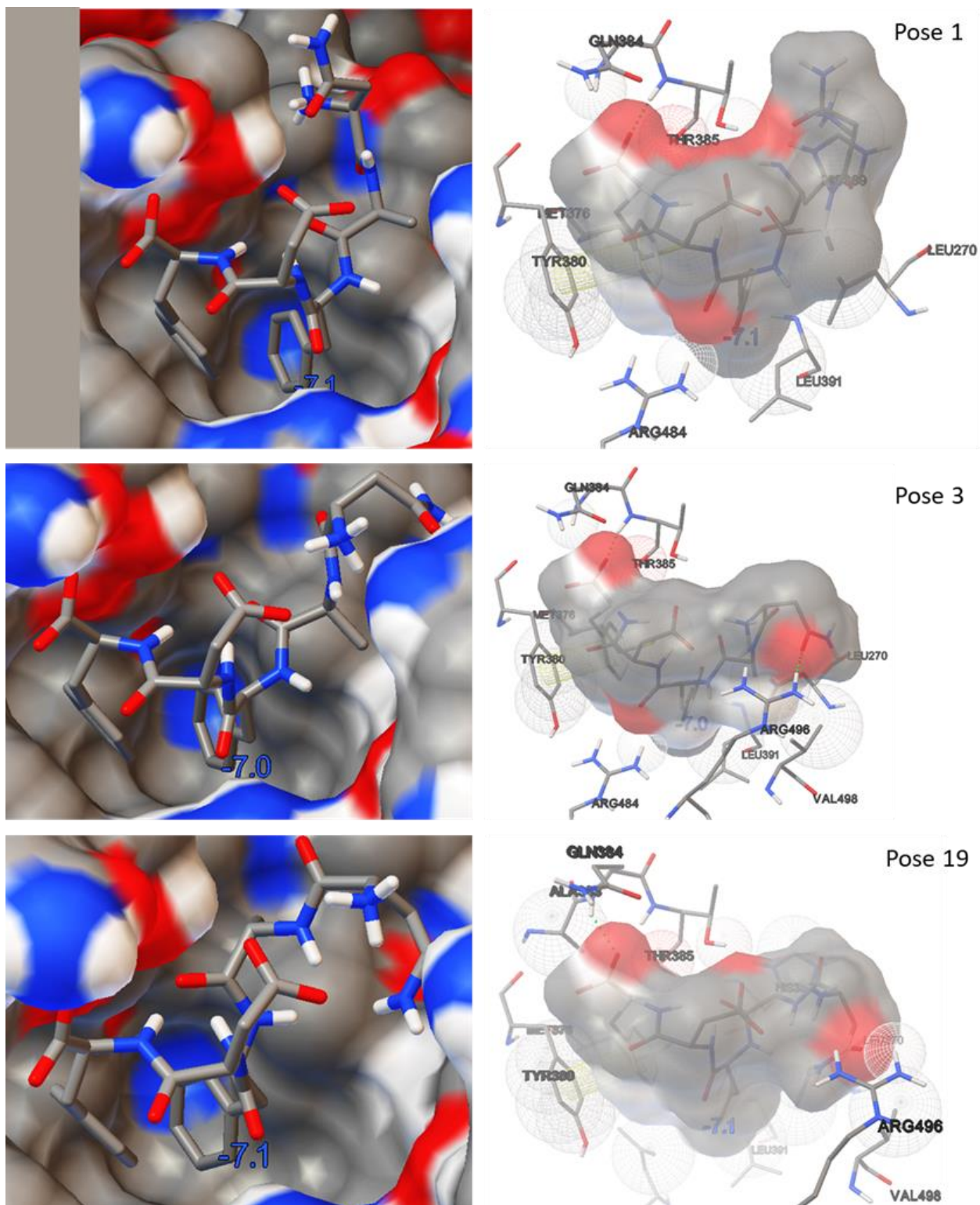


Figura 33. Acoplamiento de mayor energía—P526A. Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. El apilamiento π - π se muestra como un cilindro amarillo. En todos los casos el

péptido se ha posicionado invertido, con F529 formando el apilamiento π - π con Y380. Pose 1) El grupo carboxilo establece un enlace de hidrógeno con el grupo amino de T385; energía de afinidad = -7.1 kcal/mol. Pose 3) El grupo carboxilo establece un enlace de hidrógeno con el grupo amino de T385 y la cadena lateral de D528 forma un enlace de hidrógeno con R496; energía de afinidad = -7.0 kcal/mol. Pose 19) El grupo carboxilo establece un enlace de hidrógeno con el grupo amino de Q384; energía de afinidad = -7.1 kcal/mol.

4.4.3 F527A

Sabemos que en la posición de F527 el tamaño es importante. En la (Tabla 19) se muestra la energía de afinidad determinada para cada una de las poses resueltas cuando se sustituye el aminoácido F527 por una alanina.

$$\text{En donde: } -6.5 \leq \text{energía de afinidad} \leq -5.7 \text{ kcal/mol}$$

Tabla 19

Energía de Afinidad F527A

Pose	Energía (kcal/mol)				
	F527A (seed: -1881392772)	F527A_2 (seed: -324552232)	F527A_3 (seed: -2079238296)	F527A_4 (seed: -1328849780)	F527A_5 (seed: -1571214036)
1	-6.4	-6.4	-6.5	-6.3	-6.4
2	-6.3	-6.4	-6.4	-6.3	-6.4
3	-6.3	-6.3	-6.4	-6.1	-6.3
4	-6.2	-6.3	-6.3	-6.1	-6.3
5	-6.1	-6.2	-6.2	-6.1	-6.2
6	-6.0	-6.2	-6.2	-6.1	-6.2
7	-5.9	-6.2	-6.2	-6.0	-6.2
8	-5.8	-6.1	-6.1	-5.9	-6.1
9	-5.7	-6.1	-6.0	-5.9	-6.1

Nota: La tonalidad de los colores verde es para facilitar la visualización del intervalo de energía de las poses.

En el 44.44% de los casos (20/45 poses) F529 se acopló en la posición de F527 (Figura 34), siendo esta la principal característica del acoplamiento. Ocupar esta región es probablemente la característica más importante en el acoplamiento. El análisis no nos provee de más información.

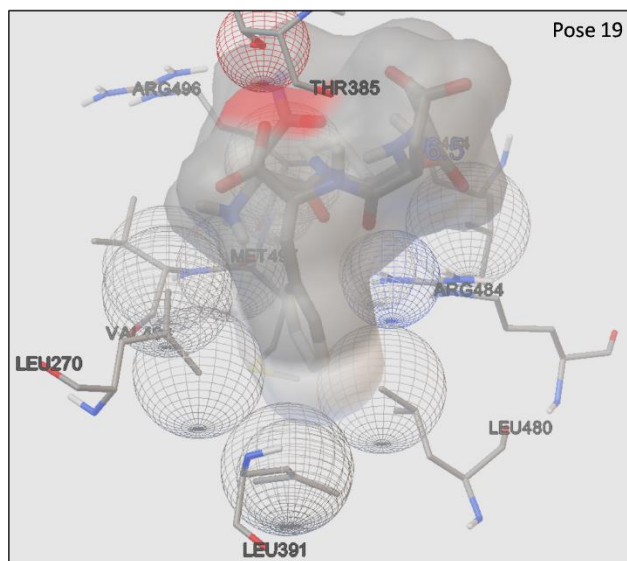


Figura 34. F529 tiende a acoplarse en la posición de F527. F529 interactúa con los residuos previamente descritos L270, L391 y L480. Energía de afinidad = -6.5 kcal/mol.

4.4.4 D528A

Hasta el momento, las interacciones que el residuo D528 puede formar no han resultado particularmente relevantes en ningún acoplamiento. En la (Tabla 20) se muestra la energía de afinidad determinada para cada una de las poses resueltas cuando se sustituye el aminoácido D528 por una alanina.

$$\text{En donde: } -7.9 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.7 \text{ kcal/mol}$$

Tabla 20

Energía de Afinidad D528A

Pose	Energía (kcal/mol)				
	D528A (seed: 2088298560)	D528A_2 (seed: -1201840608)	D528A_3 (seed: 1694323240)	D528A_4 (seed: -183012344)	D528A_5 (seed: -989766892)
1	-7.6	-7.9	-7.8	-7.6	-7.8
2	-7.5	-7.9	-7.7	-7.6	-7.7
3	-7.4	-7.8	-7.7	-7.3	-7.7
4	-7.4	-7.8	-7.6	-7.2	-7.6
5	-7.3	-7.7	-7.6	-7.1	-7.6
6	-7.2	-7.7	-7.6	-7.0	-7.5
7	-7.1	-7.6	-7.6	-6.8	-7.5
8	-7.1	-7.4	-7.4	-6.7	-7.4
9	-7.0	-7.3	-7.3	-6.7	-7.4

Nota: La tonalidad de los colores verde es para facilitar la visualización del intervalo de energía de las poses.

Observamos, de manera general, que la energía de afinidad ha aumentado ligeramente en ausencia del residuo D528. En el 48.88% de los casos (22/45 poses) los grupos fenilo ocuparon la cavidad; mientras que en el 40% de los casos (18/45 poses) la cavidad fue ocupada por P526 y F527. Cuando el péptido se ha acoplado en el sentido NPFAF (con P526 y F527 ocupando la cavidad), los acoplamientos de mayor energía de afinidad son iguales a -7.9 kcal/mol; mientras que cuando el péptido se ha acoplado en el sentido FAFPN, los acoplamientos de mayor energía de afinidad son iguales a -7.8 kcal/mol. En el primer caso ([Figura 35](#)), observamos que la principal diferencia es en la orientación de F529, lo que puede resultar en que el fenilo interactúe con L494 y el carboxilo interactúe con Y251 (pose 10) o que F529 establezca contacto con V498 y E501 (pose 11), entre otras interacciones. Por otro lado, cuando el péptido se ha acoplado en sentido contrario ([Figura 36](#)), observamos que los residuos forman el mismo tipo de interacciones que ya habíamos observado para las poses de mayor energía anteriormente descritas.

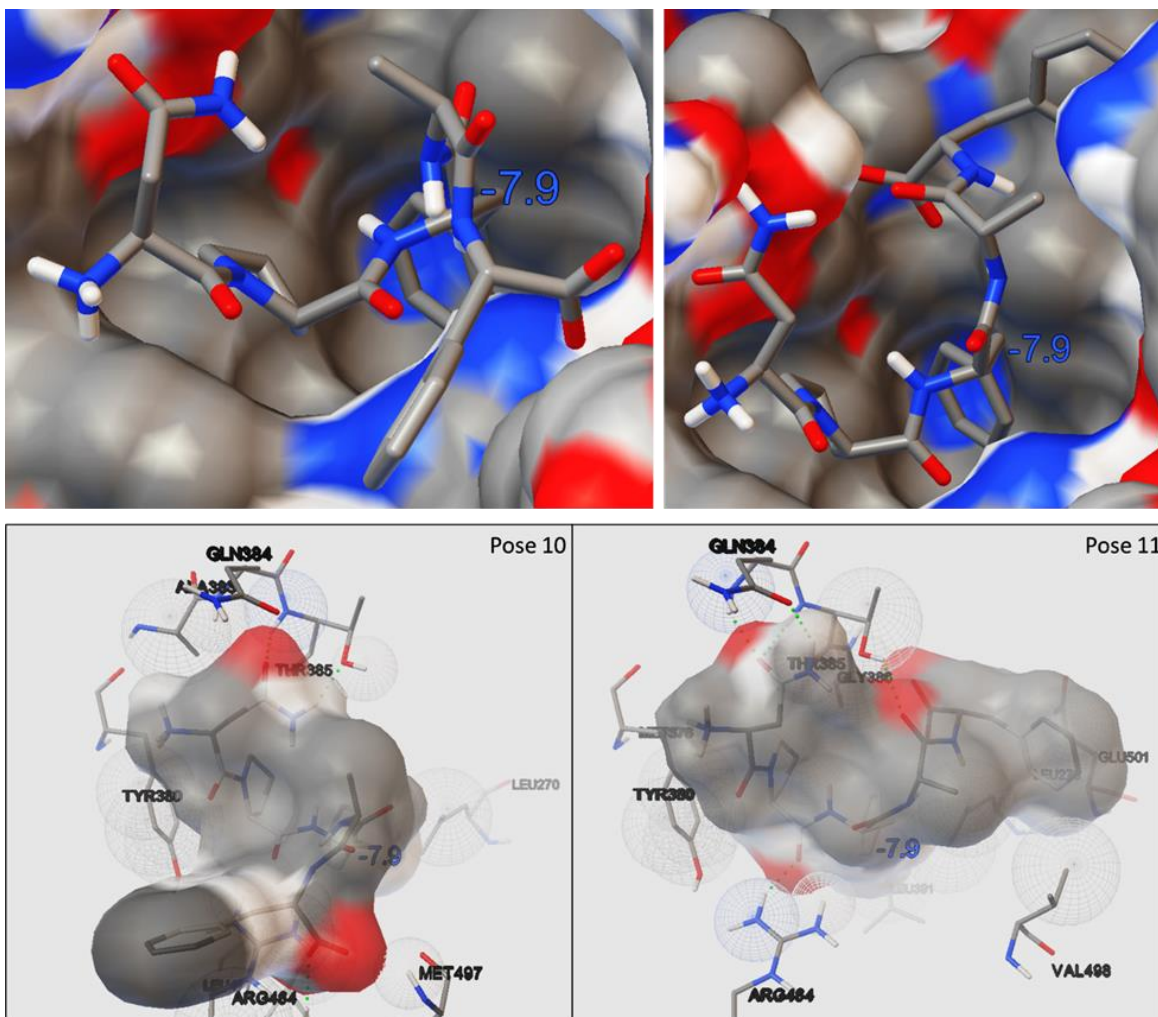


Figura 35. Acoplamiento de mayor energía—Péptido no-invertido (NPFAP). Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. Energía de afinidad = -7.9 kcal/mol.

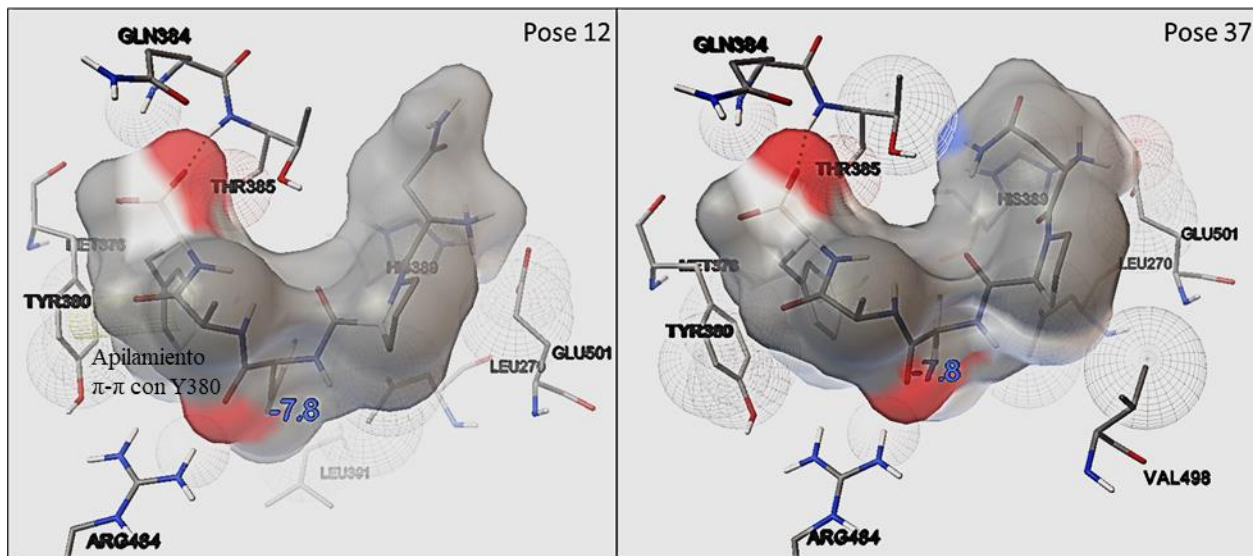
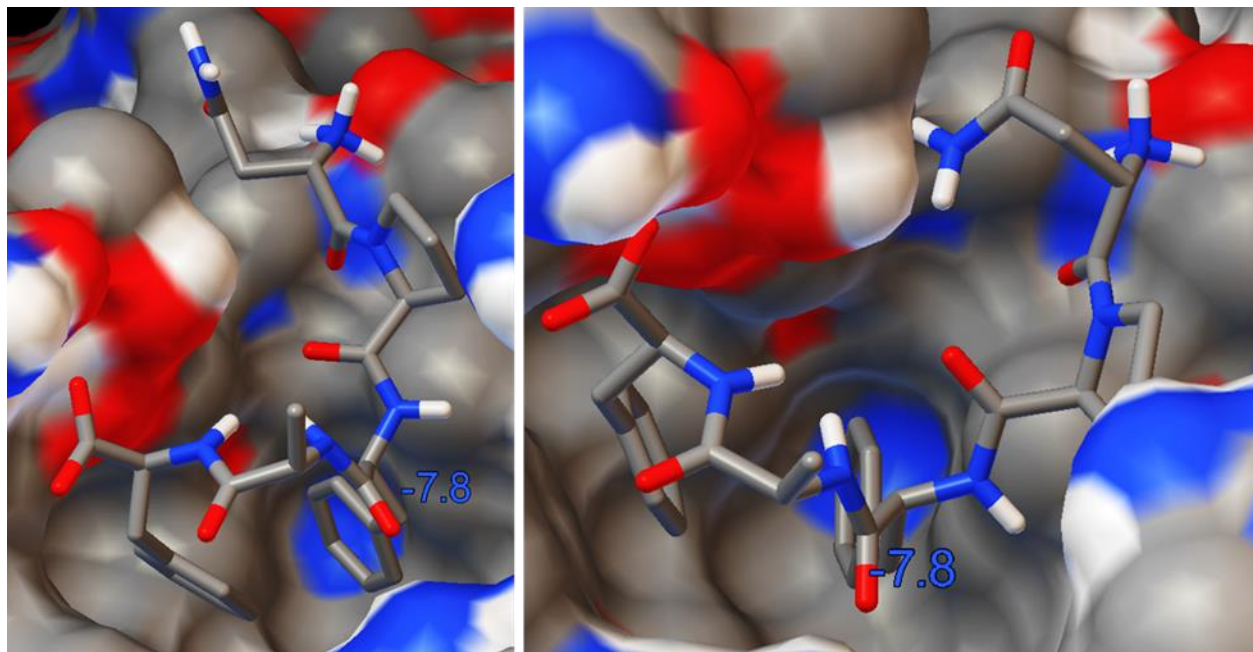


Figura 36. Acoplamiento de mayor energía—Péptido invertido (FAFPN). Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. El apilamiento π - π se muestra como un cilindro amarillo en la pose 12. Energía de afinidad = -7.8 kcal/mol.

4.4.5 F529A

Finalmente, en la (Tabla 21) se muestra la energía de afinidad determinada para cada una de las poses resueltas cuando se sustituye el aminoácido F529 por una alanina.

$$\text{En donde: } -7.4 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.1 \text{ kcal/mol}$$

Tabla 21

Energía de Afinidad F529A

Pose	Energía (kcal/mol)				
	F529A (seed: 247137952)	F529A_2 (seed: 52362424)	F529A_3 (seed: 1105716000)	F529A_4 (seed: 130325888)	F529A_5 (seed: 1191594756)
1	-7.4	-7.3	-7.3	-7.3	-7.3
2	-7.3	-7.1	-7.0	-7.2	-6.6
3	-6.9	-6.7	-6.9	-6.8	-6.5
4	-6.8	-6.6	-6.9	-6.7	-6.5
5	-6.8	-6.4	-6.8	-6.6	-6.5
6	-6.7	-6.4	-6.7	-6.5	-6.4
7	-6.5	-6.3	-6.7	-6.4	-6.3
8	-6.4	-6.1	-6.6	-6.3	-6.1
9	-6.4	-6.1	-6.4	-6.3	-6.1

Nota: La tonalidad de los colores verde es para facilitar la visualización del intervalo de energía de las poses.

En el 42.22% de los casos (19/45 poses) N525, P526 y F527 se posicionan de la misma manera que en el cristal. Las poses de mayor energía de afinidad se acoplaron de esta manera (Figura 37). La principal diferencia entre las poses es la orientación de D528 y A529; de manera similar a los casos *a-1* y *b-1* del péptido WT (sección 4.3.1), el carboxilo terminal a veces se posiciona en la región polar adyacente, lo que puede resultar en que P526 ya no establezca contacto con Y380. Cuando P526 no se ha acoplado como en el cristal, en general se encuentra estableciendo los contactos que F529 solía establecer; mientras que en por lo menos el 82.22% de los casos (37/45 poses), F527 se posiciona de la misma manera que en el cristal; esto nos permite concluir que el establecimiento de contactos en la posición 529 es determinante en el acoplamiento, pero que la prioridad es ocupar la posición de F527.

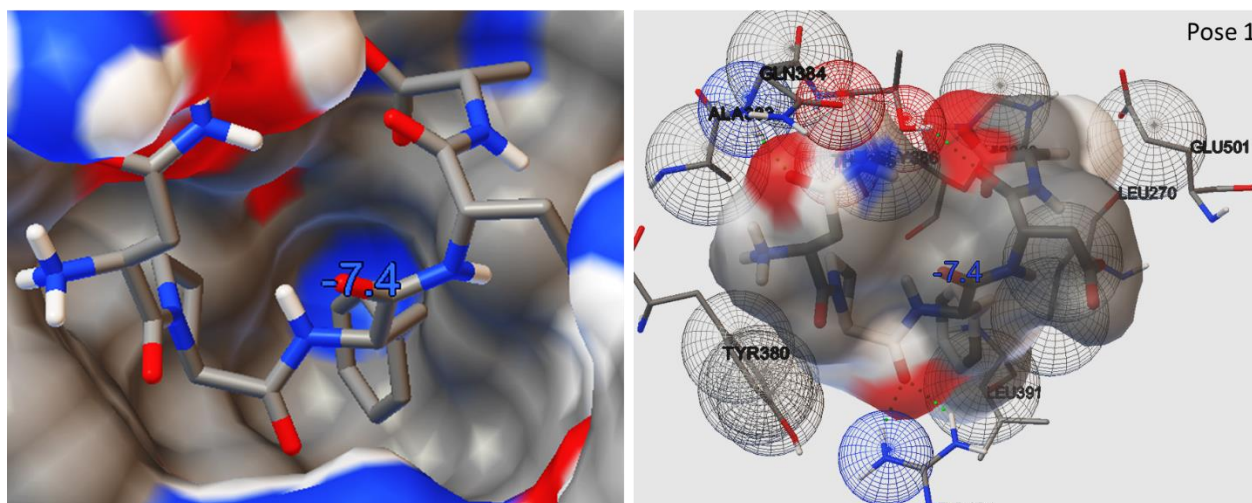


Figura 37. Acoplamiento de mayor energía—F529A. Las líneas punteadas muestran los enlaces de hidrógeno. Energía de afinidad = -7.4 kcal/mol.

En contraste con la literatura ([secciones 1.8.1 y 1.8.2](#)), la única interacción que no se observaron en el acoplamiento fue la interacción hidrofóbica entre V499 y F527. La interacción entre V499 y F527 tampoco se había observado en el análisis por *LigPlot+*. En el acoplamiento la cadena lateral de la valina no se encuentra lo suficientemente cerca como para interactuar con F527; de manera similar a lo que ocurrió con las interacciones de V513, esto podría deberse a que se utilizó un cristal distinto y no necesariamente a que V499 no interactúe con F527.

Discovery Studio reconoce un mayor rango de tipos de interacciones que *Autodock-Tools*, por lo que la clasificación del tipo de interacciones formadas difiere entre ambos programas; no obstante, en general se observa la participación de los mismos residuos ([sección 4.1.3](#)). Además de la interacción hidrofóbica con V499, las principales diferencias son que 1) en el acoplamiento A383 no suele interactuar con P526, 2) H389 no forma una interacción de tipo π - π en forma de T con F529 y 3) R484 no interactúa con D528.

4.5 Modelo farmacofórico de los residuos 525-529 del brazo C-terminal

Con base en los resultados previos, se utilizó *Pharmit* para llevar a cabo la búsqueda de moléculas similares a los residuos 525-529 en la base de datos ZINC, la cual alberga compuestos que pueden adquirirse en el mercado. Se diseñaron dos modelos farmacofóricos ([Figura 38](#)) que incluyen diferentes grupos funcionales y características de la forma. Para llevar a cabo su diseño se utilizó la conformación del pentapéptido cuando DBP se encuentra en modo de dímero (PDB: 1ADU). Como se ha discutido previamente, en la posición de N525 un grupo aceptor de enlace de hidrógeno permite interactuar con la región de Q384/T385. En la posición de P526 un grupo hidrofóbico y aromático permite establecer varios contactos con T380. En la posición de F527 un grupo hidrofóbico y voluminoso permite establecer el mayor número de contactos. Cuando solamente consideramos al pentapéptido, D528 es útil como un espaciador entre las fenilalaninas, ya que esto permite que el anillo de F529 se posicione de tal manera que puede establecer

diferentes interacciones hidrofóbicas con los residuos en esta región. Con base en estas características se propuso el primer modelo; sin embargo, los 33 compuestos que se encontraron presentaban una energía de afinidad minimizada de entre -4.5 a -6.8 kcal/mol y un RMSD minimizado de 1.2 hasta 6.6 Å.

Por tanto, se propuso el segundo modelo “menos específico”. En este caso, se mantuvo el grupo aceptor de enlace de hidrógeno en la posición de N525, en la región de P526 ya no se especificó que el grupo hidrofóbico además tuviese que ser aromático y en la región de F527 se especificó que, además de un grupo hidrofóbico, este debía ser aromático. Sabemos que si en la posición de P526 se ubica un grupo aromático, este puede establecer interacciones de tipo π - π con Y380, pero no es esencial que se establezcan este tipo de interacciones. Por otro lado, como se observó en la mayoría de los acoplamientos —en especial durante el *alanine scanning* de F527—, es esencial ocupar la región en donde F527 se ancla; aunque no hay indicios de que las propiedades aromáticas del grupo fenilo sean esenciales en el acoplamiento en esta región, sabemos que un grupo funcional como este se acopla bien en la cavidad y que, por tanto, es importante considerar un grupo fenilo en esa posición. Respecto a las restricciones de la forma, estas se redujeron al esqueleto de la cadena principal del resto del péptido, ya que es importante que se establezca la mayor cantidad de contactos en la cavidad. Con este modelo se aumentó la cantidad de compuestos que cumplían con las características deseadas, por lo que la búsqueda se limitó a compuestos con una energía de afinidad ≤ -7.0 kcal/mol y un mRMSD ≤ 2.0 Å. Se encontraron hasta 30 compuestos distintos, de los cuales se seleccionaron 12 ([Tabla 22](#)). Los compuestos que se seleccionaron presentan una energía de afinidad minimizada mayor a -7.3 kcal/mol; se utilizó este criterio debido a que la energía de afinidad de la poses que reprodujeron el posicionamiento del péptido WT en el cristal, fue de -7.3 kcal/mol.

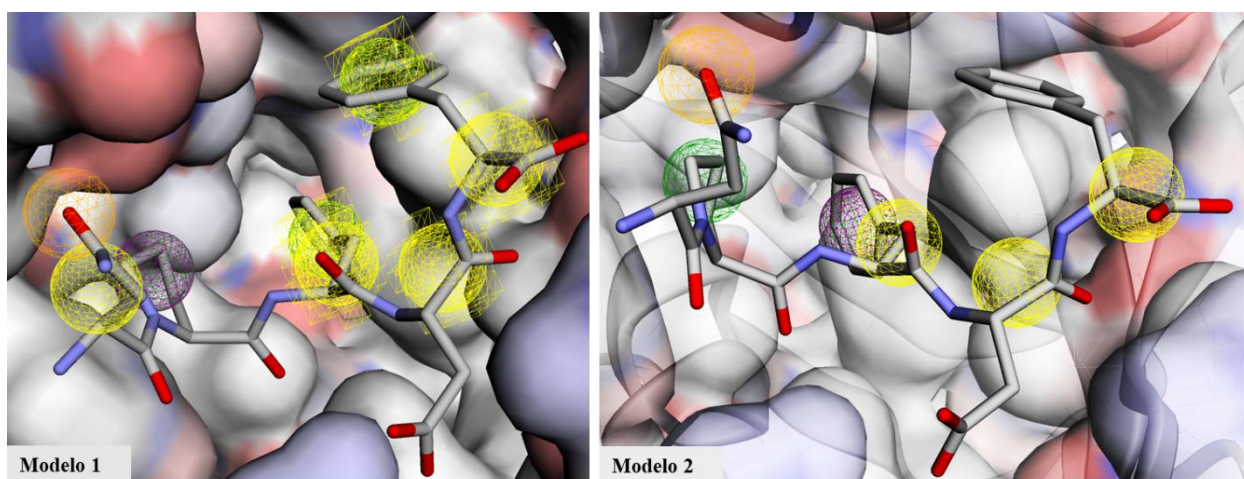
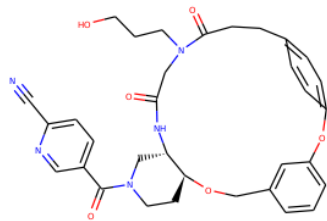
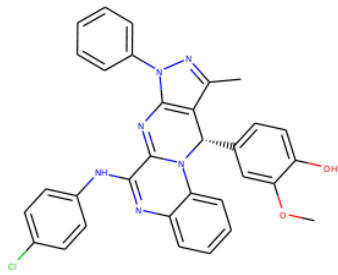
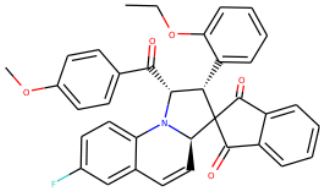
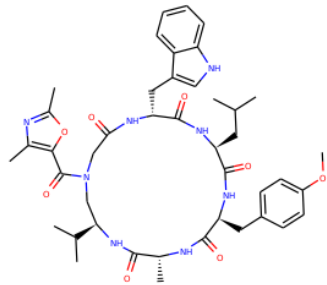
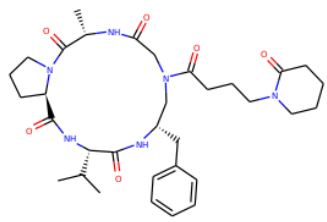
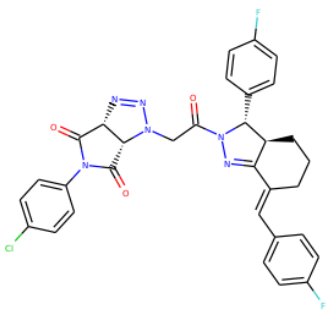
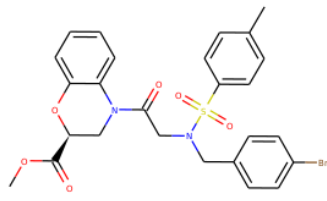
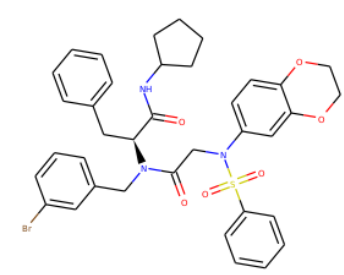
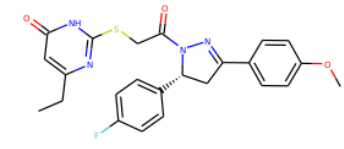
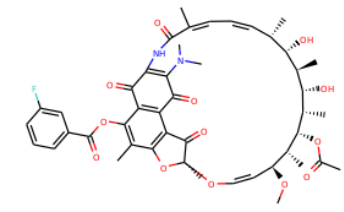
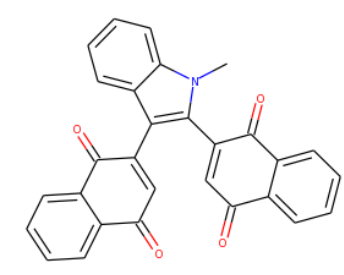


Figura 38. Modelos farmacofóricos. Esfera **anaranjada**: grupo aceptor de enlace de hidrógeno. Esfera **verde**: grupo hidrofóbico. Esfera **morada**: grupo aromático. Esfera **amarilla**: restricciones de la forma.

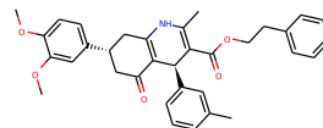
Tabla 22*Moléculas seleccionadas*

Compuesto	Nombre (ID)	RMSD minimizado (Å)	Energía de afinidad minimizada (kcal/mol)	Intervalo de Energía de afinidad (kcal/mol)	Estructura 2D
M1	ZINC952855958	1.8	-8.7	-8.2/-6.2	
M2	ZINC1815577	1.7	-8.1	-8.8/-7.3	
M3	ZINC102870285	0.7	-7.9	-7.7/-7.0	

M4	ZINC1704322927	1.6	-7.9	-8.4/-7.2	
M5	ZINC1704321328	1.7	-7.9	-8.6/-7.7	
M6	ZINC245240021	1.5	-7.8	-9.1/-7.4	
M7	ZINC226026272	1.9	-7.7	-7.9/-6.9	

M8	ZINC225000840	1.8	-7.6	-8.6/-7.8	
M9	ZINC10186319	1.2	-7.6	-7.6/-6.3	
M10	ZINC254836918	1.4	-7.6	-7.3/-5.3	
M11	ZINC1692033	1.2	-7.6	-9.4/-7.9	

M12 ZINC101194686 1.4 -7.4 -7.7/-6.9



Nota: Los valores de RMSD y energía de afinidad minimizada fueron resueltos mediante *Pharmit*. El acoplamiento de cada molécula (intervalo de energía de afinidad) se llevó a cabo por lo menos tres veces mediante *AutoDock-VINA*. El acoplamiento de las moléculas M2, M5, M6, M8 y M11 se realizó cinco veces con cinco semillas aleatorias distintas para cada compuesto.

La energía de afinidad observada en los acoplamientos mediante *AutoDock-VINA* difiere un poco de la energía de afinidad minimizada resuelta por *Pharmit* (mediante *VINA*), lo cual permitió identificar a los compuestos que tienden a acoplarse de formas energéticamente más favorables.

4.5.1 Características del acoplamiento de los compuestos con mayor energía de afinidad

Compuesto M2

El compuesto M2 ($-8.8 \leq$ energía de afinidad ≤ -7.3 kcal/mol) posee 3 grupos que suelen acoplarse en la posición de F527 ([Figura 39](#)). Siempre que uno de los 3 grupos está ocupando la posición de F527, son los otros dos los que establecen el resto de las interacciones. El resto de la molécula funge de manera similar a la cadena principal del péptido, i.e. no suele establecer ninguna interacción, pero ocupa la cavidad y permite que los anillos se orienten de tal manera que establecen diferentes interacciones hidrofóbicas. Los acoplamientos de mayor energía ([Figura 40](#)) ocurren cuando el grupo #2 ocupa la posición de F527. Aparentemente, la ausencia de un grupo aceptor de enlace de hidrógeno en la posición de N525 no tiene efecto en la energía de afinidad, siempre y cuando se establezcan múltiples contactos en la cavidad.

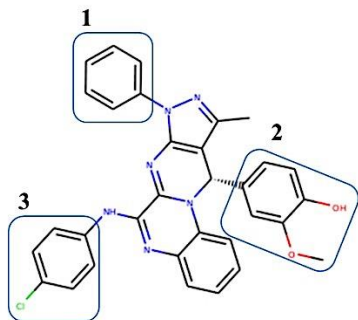


Figura 39. *Compuesto M2*. Los recuadros en azul indican los grupos referidos en el texto.

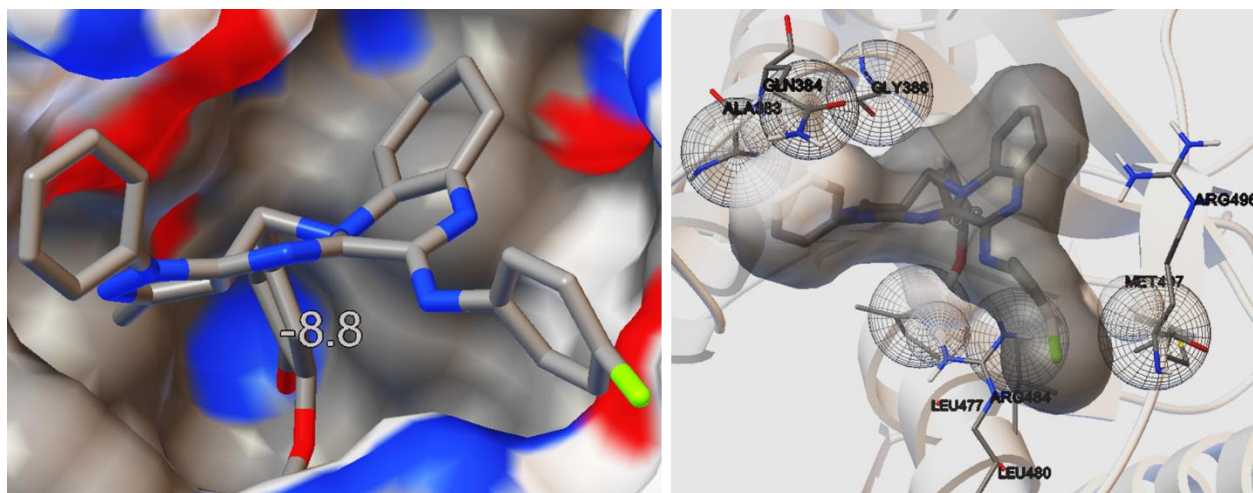


Figura 40. *Compuesto M2—Acoplamiento de mayor energía—ejemplo.* Se muestra la pose 37. Energía de afinidad: -8.8 kcal/mol.

Compuesto M5

El compuesto M5 ($-8.6 \leq$ energía de afinidad ≤ -7.7 kcal/mol) posee 2 grupos que suelen acoplarse en la posición de F527 (Figura 41). Los acoplamientos de mayor energía (Figura 42) ocurren cuando el grupo #2 ocupa la posición de F527 y el grupo #1 interactúa con los residuos en las posiciones de N525 y P526; sin embargo, la tasa de este acoplamiento de mayor energía es tan sólo del 13.33% (6/45 poses). La mayoría de los acoplamientos son de menor energía en contraste con el compuesto M2. En este caso, el resto de la molécula sí participa en la formación de interacciones con otros residuos de la cavidad; se establecen principalmente interacciones hidrofóbicas, pero en ocasiones los grupos aceptores de enlace de hidrógeno del heterociclo interactúan con T385, R484 o R496.

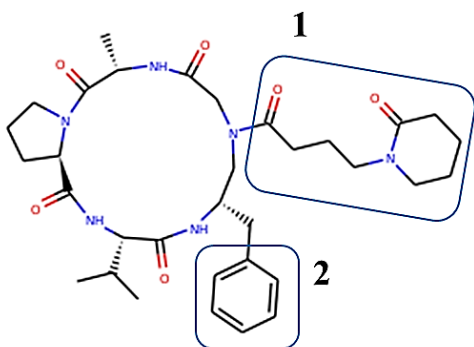


Figura 41. *Compuesto M5.* Los recuadros en azul indican los grupos referidos en el texto.

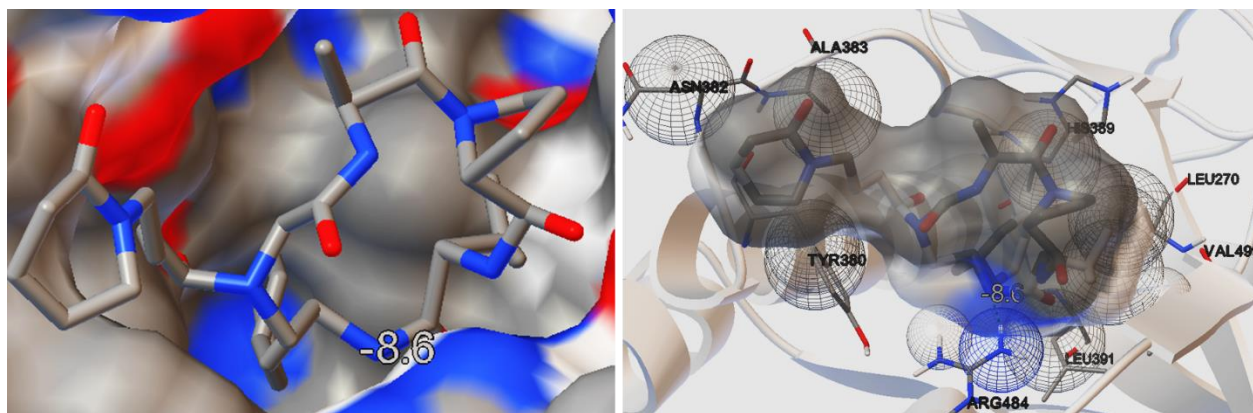


Figura 42. *Compuesto M5—Acoplamiento de mayor energía—ejemplo.* Se muestra la pose 10.

Compuesto M6

El compuesto M6 ($-9.0 \leq$ energía de afinidad ≤ -7.4 kcal/mol) posee 3 grupos que suelen acoplarse en la posición de F527 ([Figura 43](#)). Resulta interesante que cada uno de los tres grupos presenta la misma tasa de acoplamiento en la posición de F527: 26.66% (12/45 poses). Pero con una afinidad decreciente:

grupo 1 (-8.5kcal/mol) > grupo 3 (-8.2 kcal/mol) > grupo 2 (-7.9 kcal/mol).

Los acoplamientos de mayor energía ([Figura 44](#)) ocurren cuando el grupo #1 se acopla en esta región; sin embargo, como se muestra en la figura 44, la orientación del cuarto grupo puede afectar la energía de afinidad en hasta 0.6—0.8 kcal/mol. Podemos observar que cuando el compuesto M6 se encuentra acoplado de esta manera, establece una gran cantidad de contactos con varios de los residuos de la cavidad ([Figura 45](#)) y que el cambio en la orientación del cuarto grupo ocasiona que disminuyan los contactos.

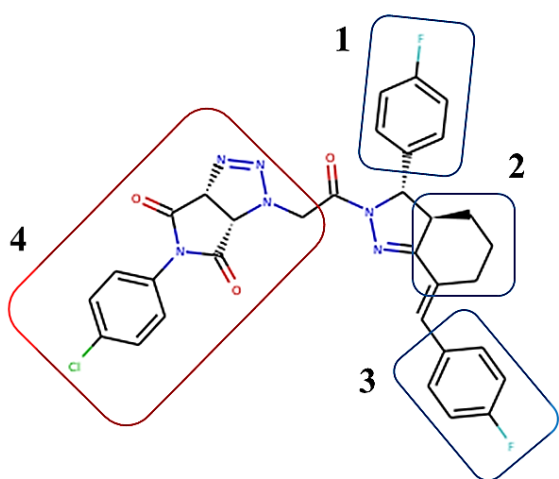


Figura 43. *Compuesto M6.* Los recuadros en azul y rojo indican los grupos referidos en el texto.

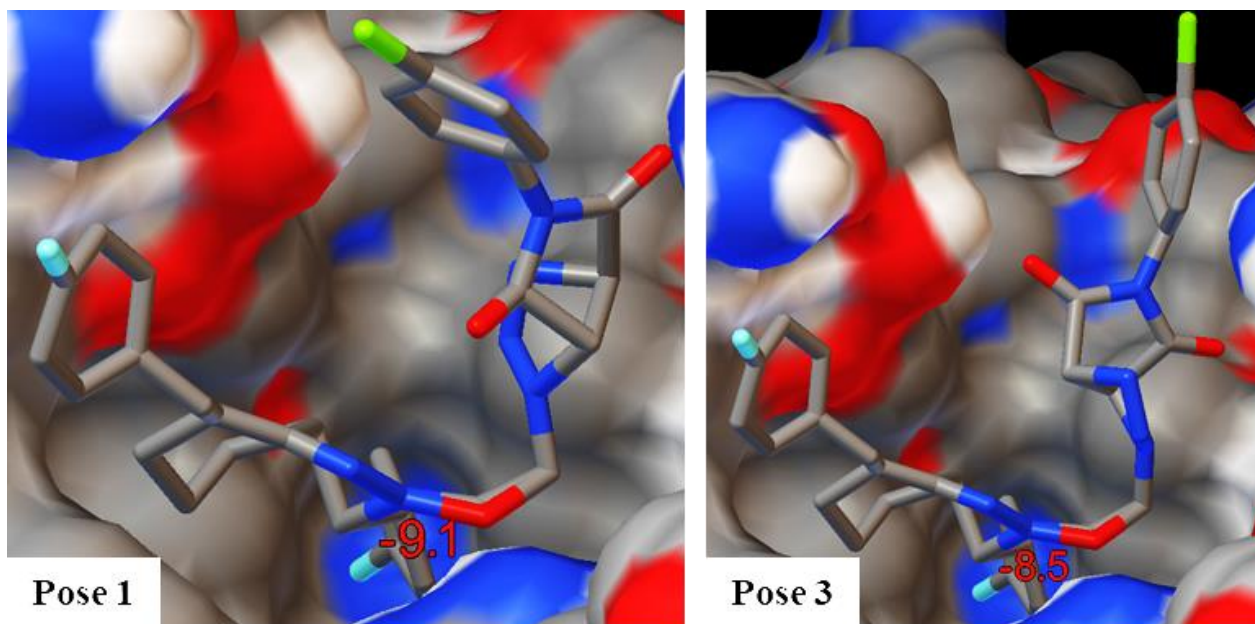


Figura 44. *Compuesto M6—Acoplamiento de mayor energía y cambio en la orientación del cuarto grupo. Esto ocurre de manera análoga entre las poses 10 y 12, 37 y 39.*

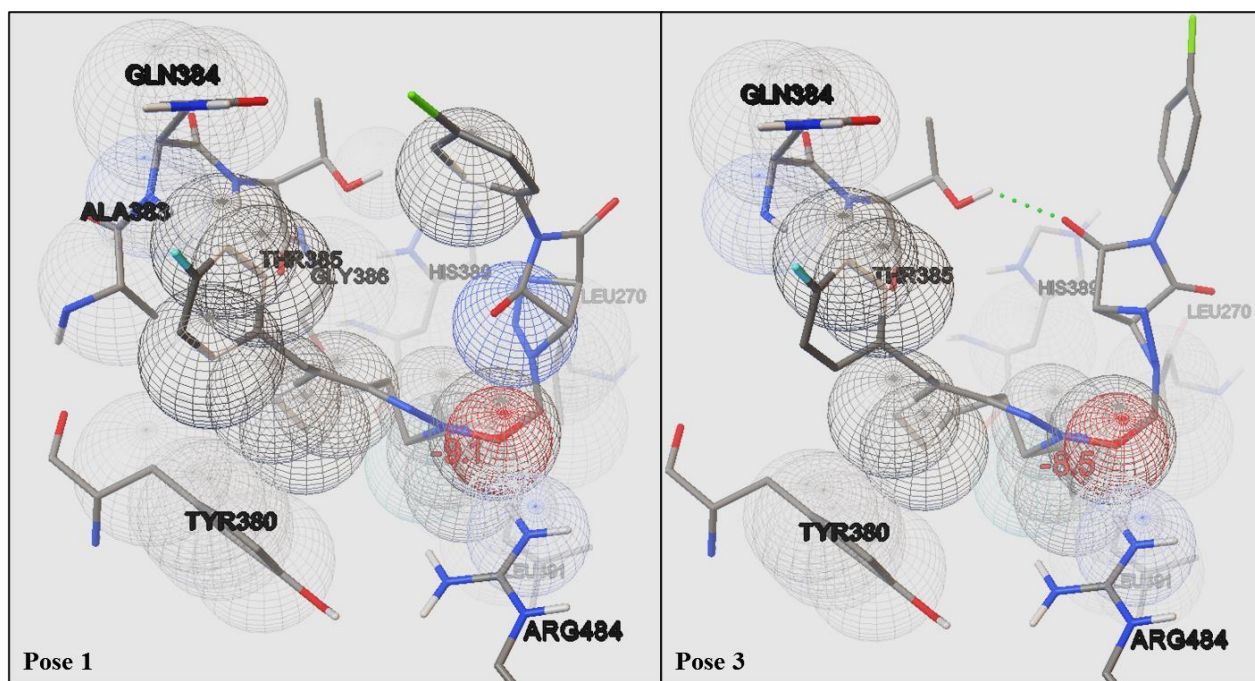


Figura 45. *Compuesto M6—Interacciones del acoplamiento de mayor energía y efecto del cambio en la orientación del cuarto grupo.*

Compuesto M8

En contraste con las demás moléculas, en donde ocupar la región de F527 es la principal característica del acoplamiento, el compuesto M8 ($-8.6 \leq \text{energía de afinidad} \leq -7.8 \text{ kcal/mol}$) posee 3 grupos que, de manera similar a los acoplamientos con el péptido invertido, suelen establecer interacciones de tipo π - π con Y380 (Figura 46). En el 73.33 % de los casos (33/45 poses) se observa la formación de estas interacciones. Por su forma, cuando uno de estos grupos (generalmente el primero o el segundo) se encuentra interactuando con Y380, otro puede ocupar la posición de F527. En los acoplamientos de mayor energía (Figura 47) se observa el apilamiento π - π en 2 de las 3 poses; de nuevo, aunque sabemos que un grupo aromático en la posición de P526 puede establecer este tipo de interacciones con Y380, su formación no es esencial. El tamaño y forma del compuesto le permite establecer varios contactos con la cavidad independientemente de que se establezca el apilamiento π - π , lo que resulta en varios acoplamientos con una energía de afinidad favorable.

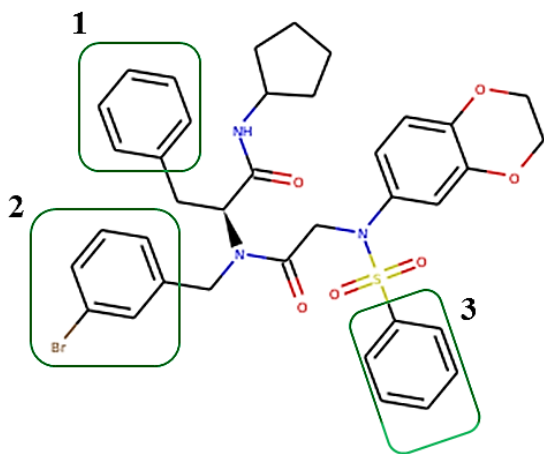


Figura 46. *Compuesto M8.* Los recuadros verdes indican los grupos referidos en el texto.

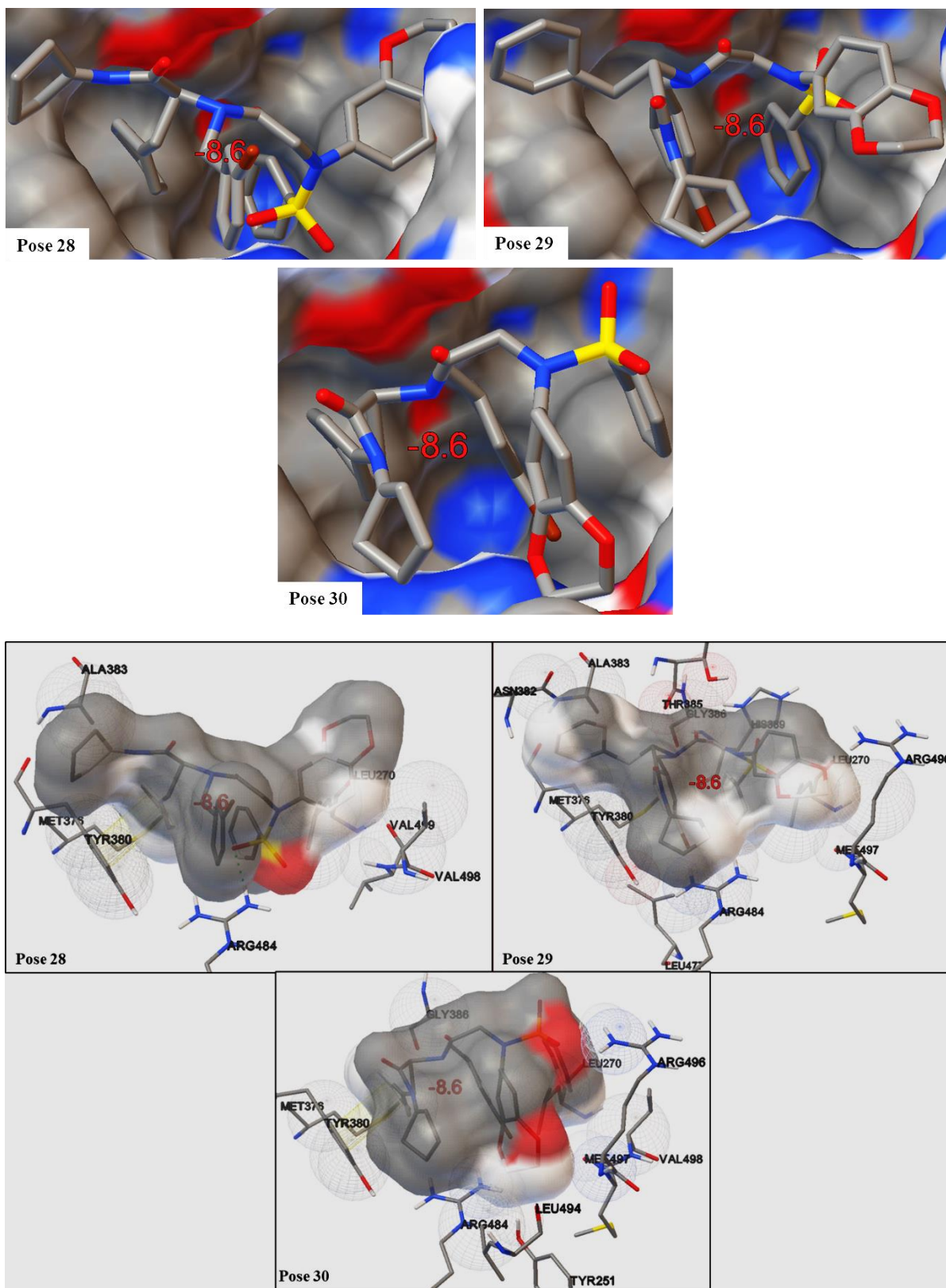


Figura 47. *Compuesto M8—Acoplamiento de mayor energía.* En la pose 29 no se formó el apilamiento π - π .

Compuesto M11

De todos los compuestos, el compuesto M11 presenta la mayor energía de afinidad ($-9.4 \leq$ energía de afinidad ≤ -7.9 kcal/mol) y posee 2 grupos que suelen posicionarse en la región de F527 ([Figura 48](#)). El grupo #1 ha ocupado la posición de F527 en el 40% de los casos (18/45 poses) con una energía de afinidad media igual a -8.9 kcal/mol; mientras que el grupo #2 la ha ocupado en el 35.55% de los casos (16/45 poses) con una energía de afinidad media igual a -8.5 kcal/mol. Respecto a las poses de mayor energía ([Figura 49](#)), se observa que cuando el grupo #1 se encuentra en la región de F527, este puede acomodarse en dos sentidos sin que haya una disminución significativa en la energía de afinidad; de manera similar al péptido, su forma recuerda a la letra T. Debido a su forma es que el acoplamiento del grupo #2 es menos energético, ya que cuando este grupo se acopla en la posición de F527 la molécula ocupa menos espacio de la cavidad ([Figura 50](#)); no obstante, la energía de afinidad aún es significativa.

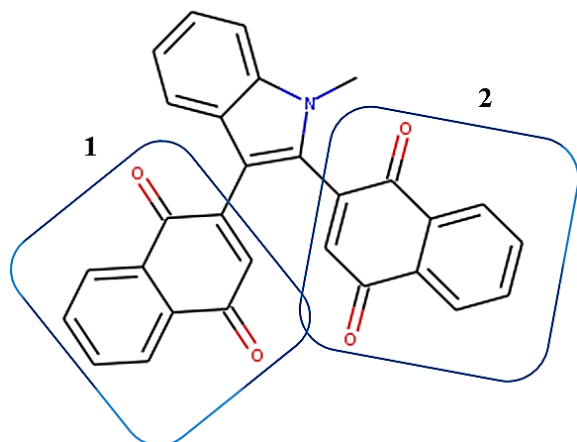
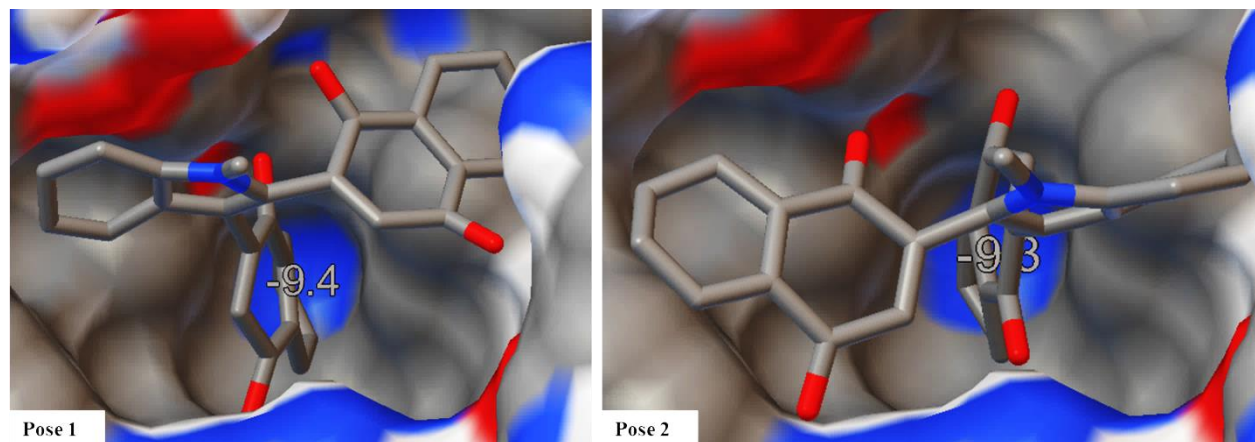


Figura 48. *Compuesto M11.* Los recuadros azules indican los grupos referidos en el texto.



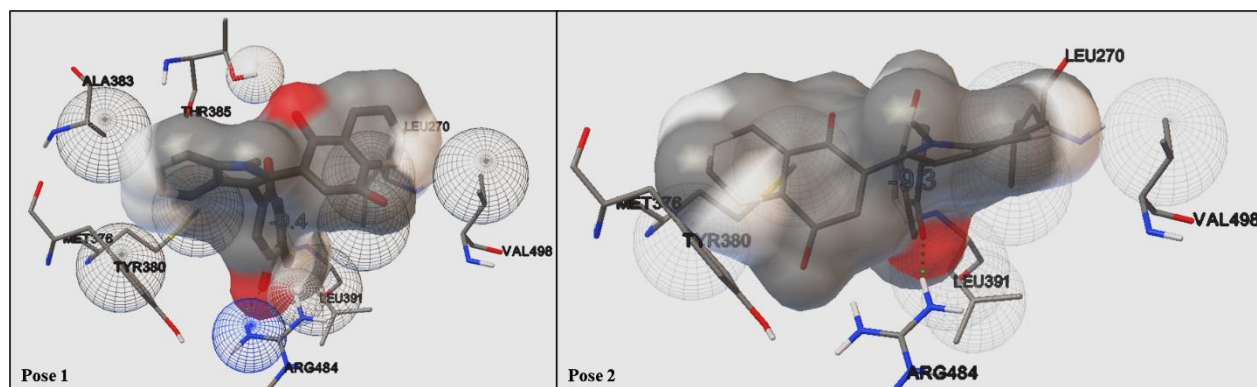


Figura 49. *Compuesto M11—Acoplamiento de mayor energía—ejemplo.* El grupo #1 ocupa la posición de F527.

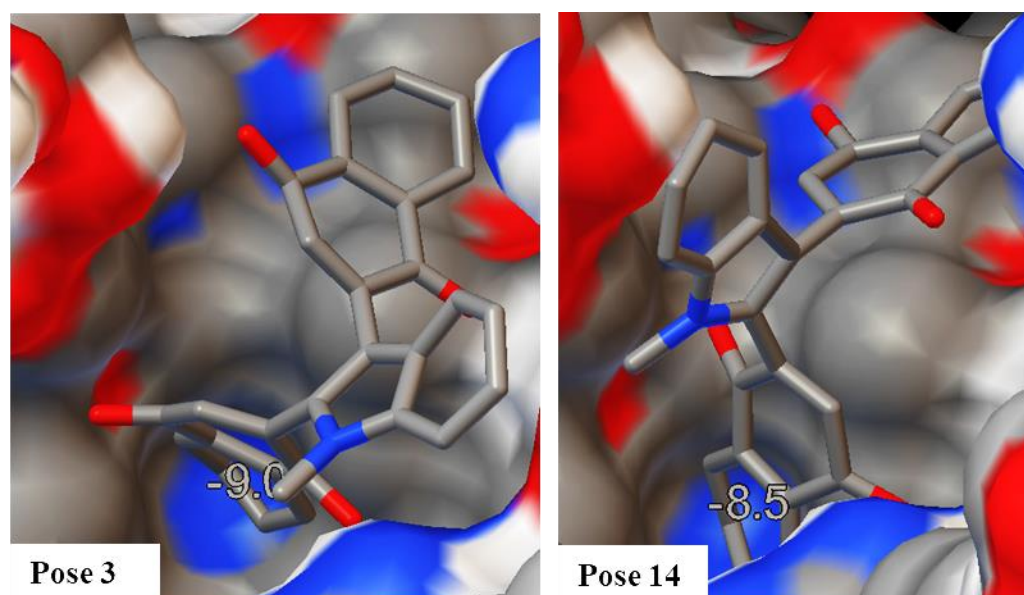


Figura 50. *Compuesto M11—Efecto en la energía de afinidad cuando el grupo #2 se acopla en la posición de F527.*

4.5.2 Características de los acoplamiento de menor energía de afinidad

Compuestos M1, M4 y M10

Respecto a los compuestos que presentan heterociclos relativamente similares a M5 ([Figura 51](#)): Los grupos del compuesto M1 que suelen acoplarse en la posición de F527, posicionan al resto de la molécula de tal manera que no abarca de manera idónea la cavidad; lo mismo ocurre con los grupos del compuesto M4, y en el caso del compuesto M10 ni siquiera se ocupa la posición de F527. Lo que resulta, en todos los casos, en una energía de afinidad más baja que M5.

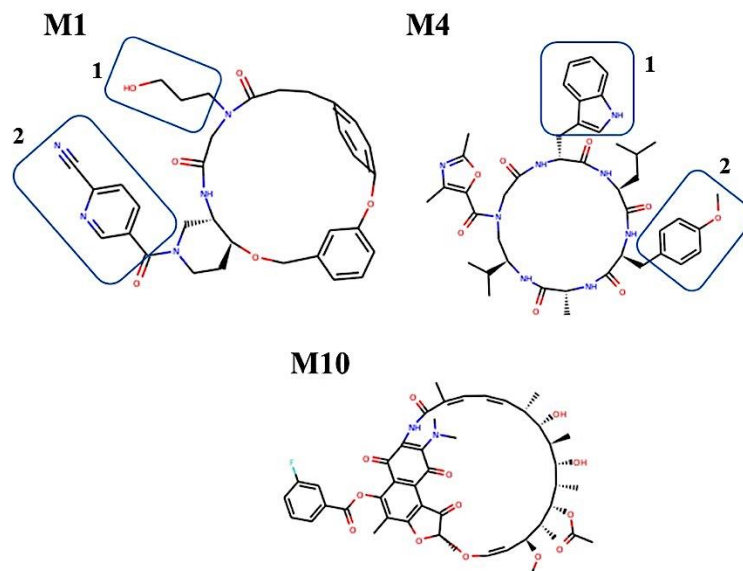


Figura 51. *Compuestos con heterociclos similares a M5.* M1: $-8.2 \leq$ energía de afinidad ≤ -6.2 kcal/mol. M4: $-8.4 \leq$ energía de afinidad ≤ -6.9 kcal/mol. M10: $-7.4 \leq$ energía de afinidad ≤ -5.3 kcal/mol. Los recuadros en azul indican los grupos referidos en el texto.

Compuesto M3

La forma y rigidez de la molécula no le permite acoplarse de manera idónea en la cavidad, por lo que ni siquiera suele ocupar la región de F527.

Compuesto M7

De manera similar al compuesto M8, la característica principal del acoplamiento no es ocupar la región de F527. El acoplamiento del compuesto M7 se ve dirigido por los grupos aceptores de enlace de hidrógeno, lo que resulta en que estos grupos tiendan a interactuar con las regiones de Q384/T385, R484 o R496. No obstante, la afinidad ($-8.1 \leq$ energía de afinidad ≤ -6.9 kcal/mol) es menor que en los casos discutidos previamente ([sección 4.5.1](#)).

Compuesto M9

A pesar de que el compuesto presenta grupos que pueden ocupar la región de F527, los acoplamientos son de baja energía de afinidad ya que se establecen pocos contactos con el resto de la cavidad.

Compuesto M12

La forma de la molécula no le permite ocupar de manera eficiente la cavidad, a pesar de que puede adquirir varias conformaciones distintas.

4.5.3 Propiedades de los compuestos con mayor energía de afinidad

En las (Figuras 52-56) se muestran las propiedades resueltas para los compuestos mediante *SwissADME*. Aunque en este estudio no se aborda el análisis de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los compuestos, podemos observar que el compuesto M11 (Figura 56) presenta un buen potencial como posible fármaco.

Compuesto M2

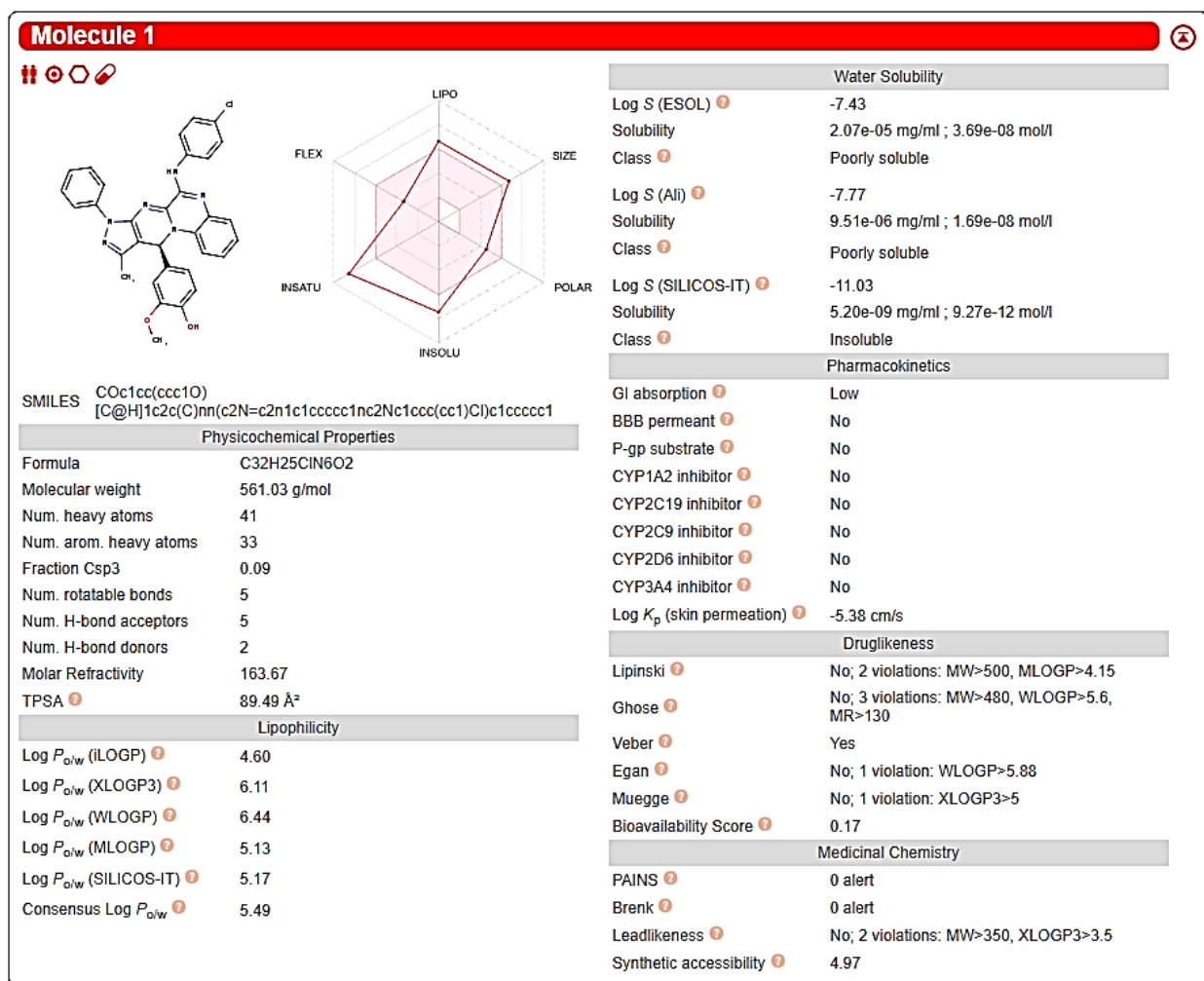


Figura 52. Propiedades del compuesto M2.

Compuesto M5

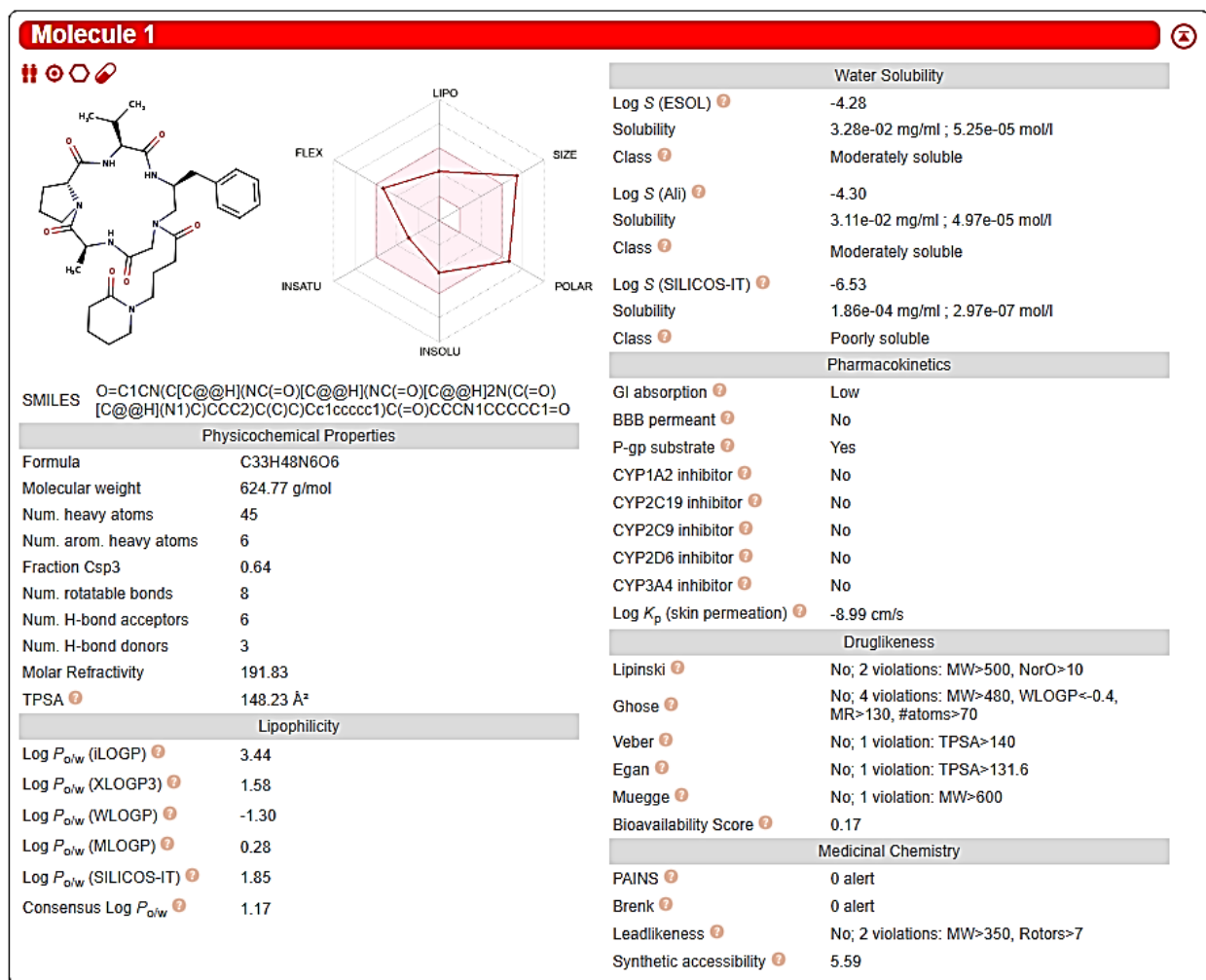


Figura 53. Propiedades del compuesto M5.

Compuesto M6

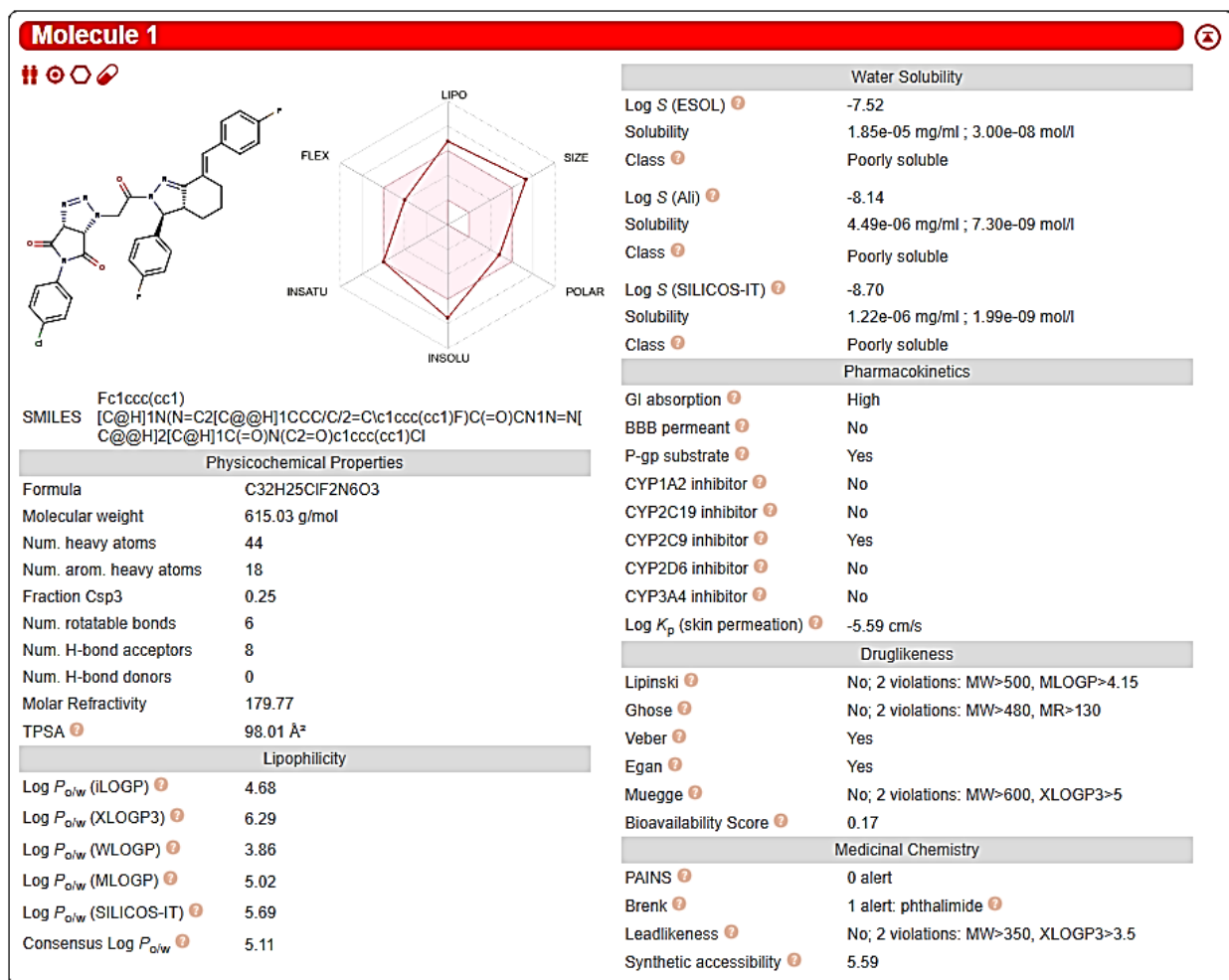


Figura 54. Propiedades del compuesto M6.

Compuesto M8

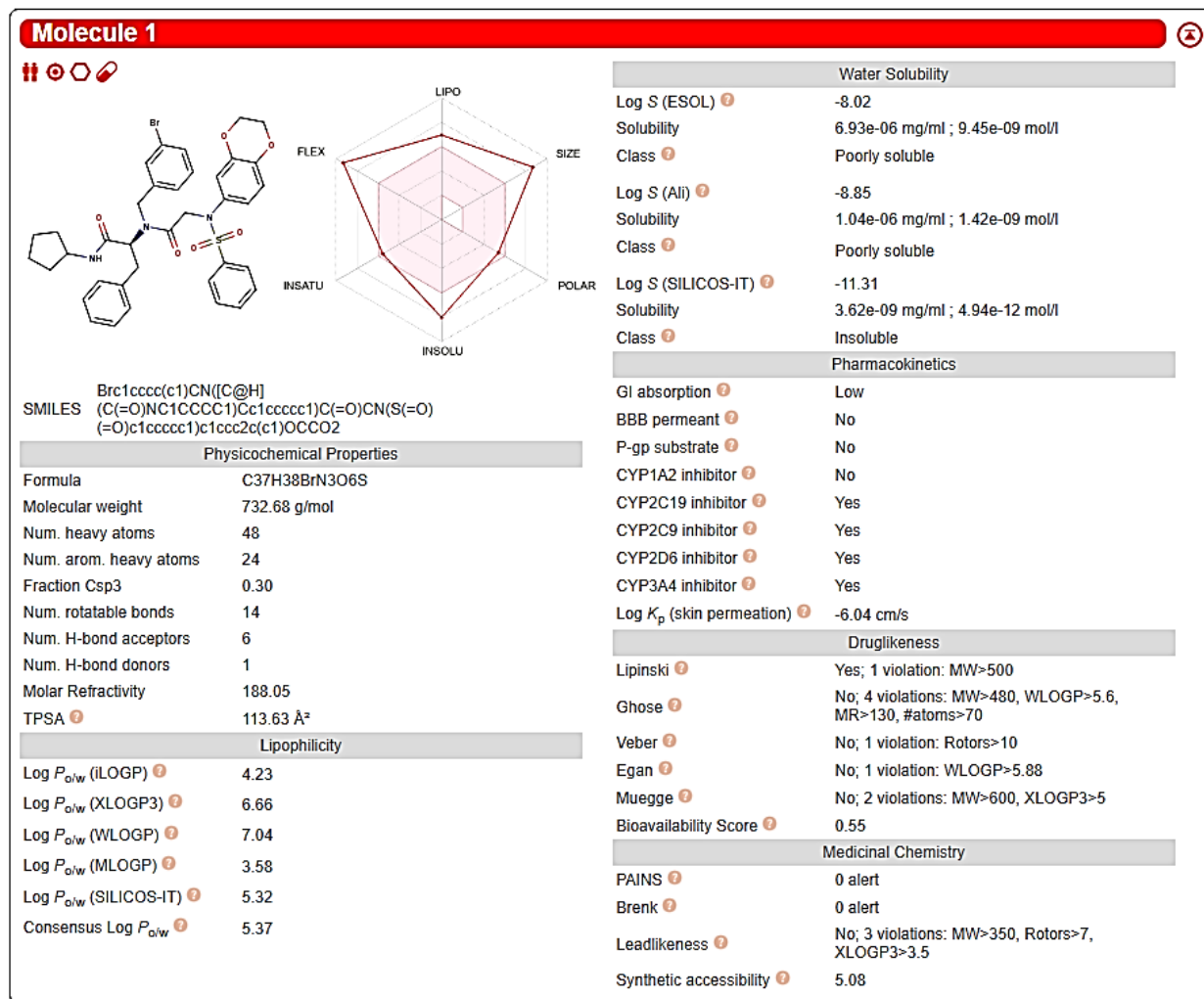


Figura 55. Propiedades del compuesto M8.

Compuesto M11

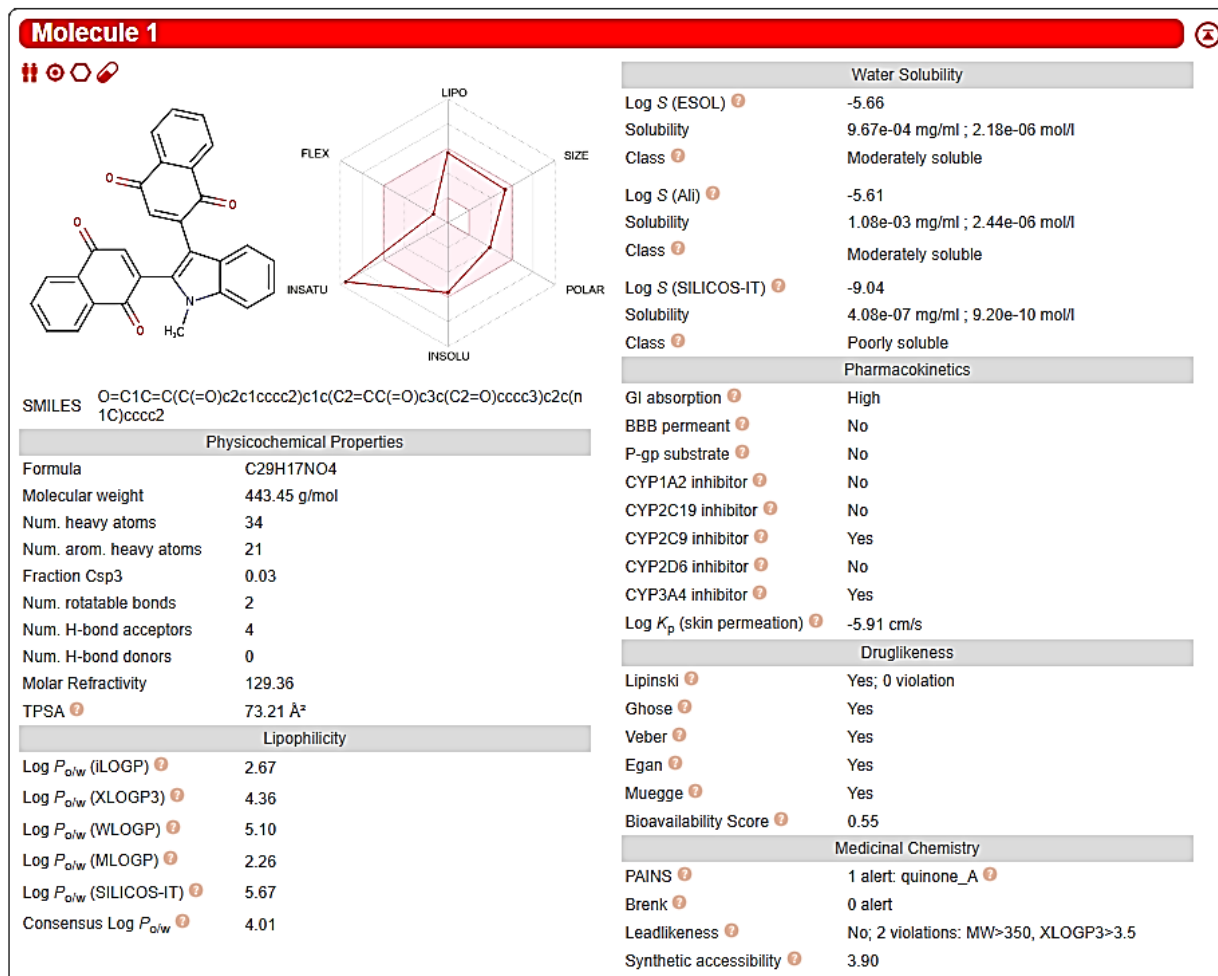


Figura 56. Propiedades del compuesto M11.

V. Discusión de Resultados

Las interacciones proteína-proteína entre el brazo C-terminal de DBP y el monómero adyacente fueron clasificadas como biológicamente relevantes, pero la interfaz no fue identificada al 100% como permanente (34%) o transitoria (66%) (Tabla 6). Un complejo proteína-proteína clasificado como permanente indica que las subunidades se desnaturalizarían tras la disociación del complejo, mientras que un complejo clasificado como transitorio indica que las subunidades son estables tanto en forma de complejo como aisladas (Fährrolfes et al., 2017; Schöning-Stierand et al., 2020); sabemos que lo segundo es cierto para DBP, pues la proteína puede existir como monómero aunque haya perdido la capacidad de multimerizarse mediante el brazo C-terminal (Dekker et al., 1997), y su multimerización es necesaria para que proceda la elongación (Charman et al., 2019).

Las interacciones intermoleculares que establece el brazo C-terminal fueron descritas hace casi 30 años y a partir de un cristal que no existe en el *Protein Data Bank* (Tucker et al., 1994). El análisis de las interacciones por *LigPlot+* y *Discovery Studio* (sección 4.1) permitió 1) contrastar la información de la literatura, 2) describir las interacciones que forman los demás residuos del brazo y no solamente aquellos que habían sido identificados como los principales responsables de la multimerización, y 3) diferenciar la clasificación de estas interacciones no solamente como enlaces de hidrógeno o hidrofóbicas. En este estudio, visualizar cuáles residuos interactúan con el brazo C-terminal nos permitió delimitar el espacio en donde realizamos el acoplamiento del péptido y los compuestos encontrados, así como contrastar las interacciones observadas en el acoplamiento vs el cristal. Nosotros optamos por utilizar como blanco biológico la cavidad hidrofóbica en donde se acoplan los residuos 525-529 (Figura 18), aunque la información sobre las interacciones que se establecen en la depresión hidrofóbica en donde se acoplan los residuos 513-516 resulta igual de importante si se propone esta región como blanco biológico.

A su vez, la información sobre el estado de conservación de la secuencia del extremo C-terminal de DBP fue descrita en 1994 y solamente para los tipos de adenovirus que habían sido identificados hasta ese momento (Tucker et al., 1994). Existen múltiples estudios sobre el genoma de diferentes tipos de adenovirus (Dhingra et al., 2019; Houldcroft et al., 2018), pero no sobre el estado de conservación de DBP específicamente (sección 4.2). En este estudio se analizaron solamente los tipos de adenovirus que están siendo actualmente estudiados en el grupo para seroprevalencia en México (Figura 17), pero se observó que los principales residuos implicados en la multimerización se encuentran conservados incluso entre adenovirus que infectan a otras especies, lo cual no ha sido reportado. Esta información podría tener múltiples implicaciones y plantea una nueva aproximación en el estudio de la proteína de unión a DNA de adenovirus.

El diseño de antivirales de amplio espectro es una necesidad que con el paso del tiempo ha cobrado cada vez más relevancia (Geraghty et al., 2021; Oksenysh & Kainov, 2022). Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado que ninguno de estos compuestos sea lo suficientemente efectivo contra adenovirus para ser aprobado para el tratamiento específico de estas infecciones. Nuestra

aproximación en el diseño de un inhibidor de interacción proteína-proteína que actúe como antagonista ortostérico de la dimerización de DBP no supone el diseño de un fármaco que actúe contra varios tipos de virus o virus con genoma de DNA, pero sí considera la posibilidad de que actúe contra varios tipos de adenovirus y no solamente adenovirus humanos ([Tablas 10 y 12](#)).

El acoplamiento molecular del péptido nos permitió esclarecer la manera en que los residuos 525-529 interactúan con la cavidad ([sección 4.3](#)). A pesar de que se trata de una simulación, el acoplamiento reprodujo en varias ocasiones poses similares al cristal, con la diferencia de que en la región en donde se posicionan los residuos D528 y F529 generalmente se observaron cambios en la orientación de cualesquiera residuos posicionados allí ([Figuras 22, 24 y 26](#)). Como lo mostró el segundo modelo farmacofórico ([sección 4.5](#)), aunado principalmente a los *Alanine Scanning* de los residuos D528 y F529 ([Figuras 35 y 37](#)), pero también al *Alanine Scanning* de P526 ([Figura 33](#)), que se establezcan múltiples contactos en esta región es suficiente.

Sabemos que no es posible que el pentapéptido se acople en sentido contrario en la naturaleza, pero las características de estos acoplamientos de mayor energía de afinidad ([Figuras 29, 31 y 36](#)) permitieron descartar algunas de las regiones que aparentemente eran importantes en el acoplamiento; en particular, observamos que se podía prescindir de la región polar compuesta por los residuos R484/Y251/M497/R496 y que en la posición de P526 existía la posibilidad de albergar otro grupo sin disrumpir las interacciones que F527 establece. En la literatura se había descrito que las interacciones por enlace de hidrógeno más relevantes eran las que se establecían con R484 (Tucker et al., 1994), lo cual tal vez es cierto para el brazo C-terminal, pero quizá no imperativo en el diseño de PPIIs. Para este estudio, por lo menos, es una característica de la cavidad que no resultó útil al proponer los modelos farmacofóricos que permitieron discriminar entre moléculas; no obstante, eso no implica que en un momento más avanzado del diseño se deba prescindir completamente de R484 u otros residuos.

Respecto a los compuestos que encontramos ([Tabla 22](#)), además de la importancia de poseer un grupo que pueda acoplarse en la posición de F527, el tamaño, forma y rigidez fueron las principales características a evaluar durante el acoplamiento de estos compuestos. Una molécula pequeña puede acoplarse de muchas más formas distintas si las interacciones que establece no son suficientemente específicas, lo cual genera incertidumbre al momento de proponer la manera en que el compuesto interactúa con la cavidad. Si la variedad de conformaciones que un compuesto puede adoptar se ve limitada por el número de sus enlaces rotables, entonces la tasa de acoplamientos similares suele ser mayor y podemos estar más seguros sobre la manera en que el compuesto tiende a interactuar con la cavidad. Una molécula demasiado grande, como M10, no puede acoplarse de forma eficiente dentro de la cavidad, lo que suele resultar en una disminución en la energía de afinidad ([Figura 51](#)). De la misma manera, si la forma de la molécula no permite que ésta se acople de manera eficiente dentro de la cavidad (como M3 o M12), esto también puede afectar la energía de afinidad ([sección 4.5.2](#)). No obstante, los compuestos que encontramos solamente los evaluamos a nivel farmacodinámico y no se tomó en cuenta ninguna propiedad farmacocinética, por lo que se requiere llevar a cabo un análisis más exhaustivo sobre el potencial

de estos compuestos de actuar como PPIIs. En particular, las características estructurales de los compuestos M2, M5, M6 y M11 llaman la atención como posibles andamios moleculares ([sección 4.5.1](#)). Sobre M8 ([Figura 47](#)), debido a que el acoplamiento no se vio dirigido por la región en donde F527 se ancla, sino por las interacciones con Y380, su potencial como andamio no queda claro. El compuesto M11 no solamente presentó la mayor energía de afinidad ([Figura 49](#)), sino que además presenta un buen potencial como posible fármaco acorde a las propiedades computadas por *SwisADME* ([Figura 56](#)).

En efecto, el diseño de PPIIs presenta múltiples retos (Basse et al., 2016; Buchwald, 2010), pero inhibir la multimerización de DBP resulta siempre en que no proceda la elongación del templado durante la replicación del DNA de adenovirus (Dekker et al., 1997, 1998; Tucker et al., 1994; Van Breukelen et al., 2000). Por tanto, es importante considerar esta aproximación.

Los análisis que hemos realizado sugieren que el *hot spot* en donde se acoplan los residuos 525-529 tiene potencial como blanco biológico; sin embargo, es importante determinar si inhibir esta única cavidad es suficiente para inhibir la multimerización. En los ensayos sobre la región de bisagra del brazo C-terminal, la pérdida de la capacidad del brazo de adquirir diferentes conformaciones resultó en que no procediera la elongación (DBP no podía desestabilizar la hebra de dsDNA): el modelo de este estudio propone que la rigidez en la región de bisagra del brazo mutado de DBP, no permitía que el brazo se “enganchara” al monómero adyacente de DBP cuando se encontraba en la horquilla de replicación ([Figura 11](#)) (Van Breukelen et al., 2000). De manera análoga, un inhibidor ortostérico de la región 525-529 tendría el mismo efecto siempre y cuando sea cierto que DBP perdió la capacidad de desestabilizar la hebra de dsDNA como consecuencia de no anclar su brazo C-terminal al monómero adyacente.

VI. Conclusiones

Se identificaron el tipo de interacciones que establecen los residuos del brazo C-terminal ([sección 4.1](#)), el estado de conservación entre diferentes tipos de adenovirus de los residuos del brazo C-terminal y de los aminoácidos con los que interactúan ([sección 4.2](#)), así como el grado de contribución de los residuos 525-529 a la energía de afinidad en la interfaz entre este pentapéptido y su región de acoplamiento en un monómero adyacente de DBP ([secciones 4.3 y 4.4](#)).

A partir de un modelo farmacofórico de los residuos 525-529 ([sección 4.5](#)), se encontraron cinco compuestos con diferente andamio molecular, que presentan intervalos de energía de afinidad mayores al pentapéptido wild type ($-7.8 \leq \text{energía de afinidad} \leq -6.7$ kcal/mol). Estos compuestos, además, presentan un RMSD minimizado ≤ 1.83 Å de la pose del péptido en el modelo farmacofórico. Por tanto, es posible que estos compuestos tengan potencial como PPIIs ortostéricos de la dimerización entre monómeros de DBP; en especial el compuesto M11, que presenta la mayor energía de afinidad y el mejor índice como posible fármaco ([Figura 56](#)) ([Tabla 22](#)).

6.1 Perspectivas

- Se requiere llevar a cabo un análisis sobre las propiedades farmacocinéticas de los compuestos propuestos, así como evaluar el acoplamiento de compuestos derivados de los compuestos ya identificados.
- Es necesario determinar si la inhibición ortostérica de la cavidad hidrofóbica en donde se anclan los residuos 525-529 es suficiente para inhibir la multimerización de DBP, usando análisis de la interacción *in vitro* con mutagénesis dirigida.
- Es necesario evaluar la actividad del compuesto M11 en cultivo celular y posteriormente *in vitro*.

VII. Referencias

- Ariga, H., Klein, H., Levine, A. J., & Horwitz, M. S. (1980). A cleavage product of the adenovirus DNA binding protein is active in DNA replication *in vitro*. *Virology*, *101*(1), 307–310. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90510-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90510-3)
- Basse, M. J., Betzi, S., Morelli, X., & Roche, P. (2016). 2P2Idb v2: update of a structural database dedicated to orthosteric modulation of protein–protein interactions. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, *2016*, 7. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAW007>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.235>
- BIOVIA Dassault Systèmes. (2021). *Discovery Studio*, v21.1.0.20298 (21.1.0.20298).
- Buchwald, P. (2010). Small-molecule protein-protein interaction inhibitors: therapeutic potential in light of molecular size, chemical space, and ligand binding efficiency considerations. *IUBMB Life*, *62*(10), 724–731. <https://doi.org/10.1002/IUB.383>
- Charman, M., Herrmann, C., & Weitzman, M. D. (2019). Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication. *FEBS Letters*, *593*(24), 3531–3550. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13695>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014). ILOGP: A simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*(12), 3284–3301. https://doi.org/10.1021/CI500467K/SUPPL_FILE/CI500467K_SI_001.PDF
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, *11*(11), 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/CMDC.201600182>

- De Jong, R. N., Van Der Vliet, P. C., & Brenkman, A. B. (2003). Adenovirus DNA replication: protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 272, 187–211. https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7_7
- Dekker, J., Kanellopoulos, P. N., Loonstra, A. K., Van Oosterhout, J. A. W. M., Leonard, K., Tucker, P. A., & Van Der Vliet, P. C. (1997). Multimerization of the adenovirus DNA-binding protein is the driving force for ATP-independent DNA unwinding during strand displacement synthesis. *The EMBO Journal*, 16(6), 1455–1463. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.6.1455>
- Dekker, J., Kanellopoulos, P. N., Van Oosterhout, J. A. W. M., Stier, G., Tucker, P. A., & Van Der Vliet, P. C. (1998). ATP-independent DNA unwinding by the adenovirus single-stranded DNA binding protein requires a flexible DNA binding loop. *Journal of Molecular Biology*, 277(4), 825–838. <https://doi.org/10.1006/JMBL.1998.1652>
- Dhingra, A., Hage, E., Ganzenmueller, T., Böttcher, S., Hofmann, J., Hamprecht, K., Obermeier, P., Rath, B., Hausmann, F., Dobner, T., & Heim, A. (2019). Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37249-4>
- Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. J. J. (2003). HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731–1737. https://doi.org/10.1021/JA026939X/SUPPL_FILE/JA026939XSI20021128_085857.TXT
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891–3898. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.1C00203/SUPPL_FILE/CI1C00203_SI_002.ZIP
- Fährrolfes, R., Bietz, S., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Otto, T., Volkamer, A., & Rarey, M. (2017). ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W337–W343. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX333>
- Farooq, Q. U. A., Shaukat, Z., Aiman, S., & Li, C.-H. (2021). Protein-protein interactions: Methods, databases, and applications in virus-host study. *World Journal of Virology*, 10(6), 288–300. <https://doi.org/10.5501/wjv.v10.i6.288>
- Flint, J., Racaniello, V., Rall, G., Skalka, A. M., & Enquist, L. (2015). Principles of Virology. In *Principles of Virology, Volume I: Molecular Biology* (4th Editio). American Society for Microbiology.
- Freceer, V. (2011). Theoretical prediction of drug-receptor interactions. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 26(3), 91–104. <https://doi.org/10.1515/DMDI.2011.014>
- Geraghty, R. J., Aliota, M. T., & Bonnac, L. F. (2021). Broad-Spectrum Antiviral Strategies and Nucleoside Analogues. *Viruses*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/V13040667>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis

- platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(8), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17/FIGURES/14>
- Hidalgo, P., & Gonzalez, R. A. (2019). Formation of adenovirus DNA replication compartments. *FEBS Letters*, 593(24), 3518–3530. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13672>
- Hidalgo, P., Ip, W. H., Dobner, T., & Gonzalez, R. A. (2019). The biology of the adenovirus E1B 55K protein. *FEBS Letters*, 593(24), 3504–3517. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13694>
- Hidalgo, P., Pimentel, A., Mojica-Santamaría, D., von Stromberg, K., Hofmann-Sieber, H., Lona-Arrona, C., Dobner, T., & González, R. A. (2021). Evidence That the Adenovirus Single-Stranded DNA Binding Protein Mediates the Assembly of Biomolecular Condensates to Form Viral Replication Compartments. *Viruses 2021, Vol. 13, Page 1778, 13(9)*, 1778. <https://doi.org/10.3390/V13091778>
- Higueruelo, A. P., Jubb, H., & Blundell, T. L. (2013). TIMBAL v2: update of a database holding small molecules modulating protein–protein interactions. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2013, 39. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAT039>
- Houldcroft, C. J., Roy, S., Morfopoulou, S., Margetts, B. K., Depledge, D. P., Cudini, J., Shah, D., Brown, J. R., Romero, E. Y., Williams, R., Cloutman-Green, E., Rao, K., Standing, J. F., Hartley, J. C., & Breuer, J. (2018). Use of Whole-Genome Sequencing of Adenovirus in Immunocompromised Pediatric Patients to Identify Nosocomial Transmission and Mixed-Genotype Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(8), 1261–1271. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIY323>
- Ison, M. G., & Hayden, R. T. (2016). Adenovirus. *Microbiology Spectrum*, 217–232. <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.DMIH2-0020-2015>
- Jiménez-García, B., Teixeira, J. M. C., Trellet, M., Rodrigues, J. P. G. L. M., & Bonvin, A. M. J. J. (2021). PDB-tools web: A user-friendly interface for the manipulation of PDB files. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 89(3), 330–335. <https://doi.org/10.1002/PROT.26018>
- Kanellopoulos, P. N., Tsernoglou, D., Van Der Vliet, P. C., & Tucker, P. A. (1996a). Conformational change of the adenovirus DNA-binding protein induced by soaking crystals with K3UO2F5 solutions. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 52(5), 942–945. <https://doi.org/10.1107/S09074444996005525>
- Kanellopoulos, P. N., Tsernoglou, D., Van Der Vliet, P. C., & Tucker, P. A. (1996b). Alternative arrangements of the protein chain are possible for the adenovirus single-stranded DNA binding protein. *Journal of Molecular Biology*, 257(1), 1–8. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0141>
- Karaca, E., & Bonvin, A. M. J. J. (2013). Advances in integrative modeling of biomolecular complexes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 59(3), 372–381. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2012.12.004>
- Khanal, S., Ghimire, P., & Dharmoon, A. S. (2018). The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES6010030>

- Koes, D. R., Baumgartner, M. P., & Camacho, C. J. (2013). Lessons learned in empirical scoring with smina from the CSAR 2011 benchmarking exercise. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(8), 1893–1904. https://doi.org/10.1021/CI300604Z/SUPPL_FILE/CI300604Z_SI_002.PDF
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols* 2017 12:2, 12(2), 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Krieger, E., & Vriend, G. (2014). YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(20), 2981–2982. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU426>
- Krissinel, E., & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), 774–797. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.05.022>
- Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(10), 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/CI200227U>
- Lynch, J. P., & Kajon, A. E. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(4), 586–602. <https://doi.org/10.1055/S-0036-1584923/ID/JR01222-36>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), gkac240–gkac240. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC240>
- Mennechet, F. J. D., Paris, O., Ouoba, A. R., Salazar Arenas, S., Sirima, S. B., Takoudjou Dzomo, G. R., Diarra, A., Traore, I. T., Kania, D., Eichholz, K., Weaver, E. A., Tuailon, E., & Kremer, E. J. (2019). A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence. *Expert Review of Vaccines*, 18(6), 597–613. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1588113>
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785. <https://doi.org/10.1002/JCC.21256>
- Naesens, L., Lenaerts, L., Andrei, G., Snoeck, R., Van Beers, D., Holý, A., Balzarini, J., & De Clercq, E. (2005). Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 1010–1016. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1010-1016.2005/ASSET/656943BC-427F-48AD-8E01-998BD6FEB21F/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0030547540003.JPEG>
- O’Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(10). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Oksenych, V., & Kainov, D. E. (2022). Broad-Spectrum Antivirals and Antiviral Drug Combinations. *Viruses*, 14(2), 301. <https://doi.org/10.3390/V14020301>

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/PRO.3943>
- Rabbani, G., Baig, M. H., Ahmad, K., & Choi, I. (2018). Protein-protein Interactions and their Role in Various Diseases and their Prediction Techniques. *Current Protein & Peptide Science*, 19(10), 948–957. <https://doi.org/10.2174/1389203718666170828122927>
- Saha, B., & Parks, R. J. (2020). Recent Advances in Novel Antiviral Therapies against Human Adenovirus. *Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 1284*, 8(9), 1284. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091284>
- Schneider, N., Lange, G., Hindle, S., Klein, R., & Rarey, M. (2012). A consistent description of Hydrogen bond and Dehydration energies in protein–ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2012 27:1, 27(1), 15–29. <https://doi.org/10.1007/S10822-012-9626-2>
- Schöning-Stierand, K., Diedrich, K., Fährrolfes, R., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Steinegger, R., & Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W48–W53. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA235>
- Schrödinger LLC. (2020). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.1* (2.4.1). <https://pymol.org/2/#page-top>
- Seto, D., Chodosh, J., Brister, J. R., Jones, M. S., & Community, M. of the A. R. (2011). Using the Whole-Genome Sequence To Characterize and Name Human Adenoviruses. *Journal of Virology*, 85(11), 5701–5702. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-11>
- Sterling, T., & Irwin, J. J. (2015). ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(11), 2324–2337. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.5B00559/ASSET/IMAGES/LARGE/CI-2015-00559J_0005.JPEG
- Sunseri, J., & Koes, D. R. (2016). Pharmit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Research*, 44(Web Server issue), W442. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW287>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455. <https://doi.org/10.1002/JCC.21334>
- Tucker, P. A., Tsernoglou, D., Tucker, A. D., Coenjaerts, F. E. J., Leenders, H., & Van der Vliet, P. C. (1994). Crystal structure of the adenovirus DNA binding protein reveals a hook-on model for cooperative DNA binding. *The EMBO Journal*, 13(13), 2994. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06598.x>
- Van Breukelen, B., Kanellopoulos, P. N., Tucker, P. A., & Van Der Vliet, P. C. (2000). The formation of a flexible DNA-binding protein chain is required for efficient DNA unwinding and adenovirus DNA chain elongation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 40897–40903. <https://doi.org/10.1074/JBC.M005745200>

- Vos, H. L., Brough, D. E., Van Der Lee, F. M., Hoeben, R. C., Verheijden, G. F. M., Dooijes, D., Klessig, D. F., & Sussenbach, J. S. (1989). Characterization of adenovirus type 5 insertion and deletion mutants encoding altered DNA binding proteins. *Virology*, *172*(2), 634–642. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90206-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90206-7)
- Wakabayashi, K., Machitani, M., Tachibana, M., Sakurai, F., & Mizuguchi, H. (2019). A MicroRNA Derived from Adenovirus Virus-Associated RNAII Promotes Virus Infection via Posttranscriptional Gene Silencing. *Journal of Virology*, *93*(2). <https://doi.org/10.1128/JVI.01265-18>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, *25*(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP033>
- Waye, M. M. Y., & Sing, C. W. (2010). Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals 2010*, Vol. 3, Pages 3343-3354, *3*(10), 3343–3354. <https://doi.org/10.3390/PH3103343>
- Zhou, P., Huang, J., & Tian, F. (2012). Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface: implications for rational drug design. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(2), 226–238. <https://doi.org/10.2174/092986712803414150>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

**SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

PRESENTE

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el **C. RODRIGUEZ VARGAS OSCAR ADRIAN** con número de matrícula **10018638** cuyo título es:

“Proteína de unión a DNA (DBP) de Adenovirus Humano Tipo 5 (HAdV-5) como blanco biológico en el diseño de antivirales contra adenovirus”.

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 29 de noviembre del 2023

Atentamente
Por una universidad culta
Una universidad de excelencia

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN	(PRESIDENTE)
DR. CARLOS DANIEL AMERO TELLO	(SECRETARIO)
DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE	(VOCAL)
DR. CÉSAR MILLÁN PACHECO	(SUPLENTE)
DR. LUIS JESÚS CÓRDOVA BAHENA	(SUPLENTE)

MIE/VRRC/eae

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2023-11-29 11:04:46 | Firmante

NZ2VxEduf6xuYDf0bWaBMSf71UkPD61vm/2Esecy/ZoFeSonFZxuE5VOVsn+jXi7E1Hq8Hq6OUAV+LtiTAKI3jzVUHyoFc4+XfxFtgiuhYd1QU8DoJ5IYGfaC13/TUHHWEKq+AiuCX1tBTjGJ6y1k1AYP2yJHG2jaHxgEwjViYply+9ba/JPJHFjbrArRhfhKUQcgdHn5asJ0FwWXe0uEQ42pgKFIB8mXPYked57UFUXN2jTqweHR97XCsXkbwSFw7gBOD9EjxgjlIw8NsA11tjvQB9j1kyAM9pS8TIFyIkFwA4GXkoTlbtKAXFWwziUlvGgC+PDtFikRvsWQ==

LUIS JESÚS CÓRDOVA BAHENA | Fecha:2023-11-29 11:52:52 | Firmante

yAPJ6v3CNEY3p2bzDsNLxLHt0pzc/3tGDF70gU0ZM6MSroqB77sFGmxmwt1XmTBtmN1cqN09nC249+PMP5GNE8jHQZ9hg7CLtUhOGiKjIHW4V6yFlixizA6ZxqPhPXwtePYUFpUzeOJPUngFzIC9HeNZiSoN07ppxmLNoIN24lpuRNvFbqVJlBf3AH5Pj/CdQ6f4Qijw1UEAewHMIOPEx1LkjpXZqXDiFwCvbcx1gPjbdurktLRey2PcuKW32fuzSS/J987RMJ7aBsWRf0nCkq9h1YD2dqJyjnbcQXehfGrqPSGdbJAu9CZQyYjvWetZRe9UnJn9v3iTgSQ==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2023-11-29 11:53:27 | Firmante

da5dk14bUwSXQnImeDkwQYB2TV2DfUplbTYFgOi57/PhqMYa5T5LielfPRTLdsfHCQhVXyns6YmYuir0Vrah+G235Qz1qM5lujkUC/rW8vrhX45TmaTSRDV5LmB/c/rg0pXZd0XdO7AaenTOia1Y05A/8vOWTBvINSyO41+fLUiEBPz1qDxytLcKBmzF9I8dv29nKkaAtcGkeICscz00bfYdh99TJAa0BhEzJ7T17Ql62z/OYwMskGZG/3cFRPk7ZGXg5xr0c3bsbOCbLDC1LHsEBreU/GXBeAZpCc0J7v4uWHof+U0Vc7Rzde5ypoJopfN1KOQj4gdseHLjQ/jg==

CESAR MILLAN PACHECO | Fecha:2023-11-29 12:09:41 | Firmante

p680A3mRUo/AGfvCJRnvnw5NAeDf4E78Q+ERfDHf70pp4rwXaEwrpxN3l/z3oAzmv07xhcXZDx+GledTCsABJLk3kaRfN6asycpp6WR/0D8WN5BH7L8uzSW6IGhNYtqsKgK/h8h2GClZ27xYR77JUwx3aj41JlQ80+hllVuo0aTlhbZ9JdwOMYeb9PUv8Qg+UYzzfVrAU++as+BN0t03Vy6b6kApLSejHtkNxePv9G7FB6qx6RcRzar2lvfYstBhR2W0ItW2PCwoC+EHgR7z+jL2W55abbEymlyF5MV2aNV46S/gOjBxLfin5K1i8j3Mag00QVpTphS0R7w==

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2023-11-29 13:50:56 | Firmante

dZLEt5fAumXGQ89QCfKdXNF1gmIQSHHKZKKV0zOZLqw03Kf/G/FSqSZpF5mU5nzvKtitr7SKtyGABXz6/5ePBHBCmidebbLQ35NFDY9IULf2bHJDD/qveuK0fRT+n7uMUE/eYeyyXLfKAB2AhKIHfKzU/jmfuXDtcHgNv9Xytrievtz9exQKANjNgXzt9Wz7EXyFt1+L30hLxbjflHXckOHpSVXQ3DpeFBqFNn9S4LEHLoswb6jST/ifS2DWOxtv9r4zIRhIGWY+M9n0Aljh6/dhYW2vVoM7Wuh7pKuAkrOyKXzAjZaDeiRRP8ezLjwRqyByLr6RJMRFHlvRQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



6RVvM2mZB

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xq8EOruHveD2SwQtFbUfFdHph8ISEBxG>

