



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Estudios bioinformáticos de la enzima convertidora de angiotensina en humanos (hACE2) para el desarrollo de posibles inhibidores contra el SARS-CoV-2.

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Jhoni Javier Hoyos Caicedo

Tutor: PhD. David Andrés Terán Mera

Ambato - Ecuador

Enero - 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

David Andrés Terán Mera, PhD.

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 21 de diciembre del 2020

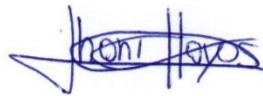
David Andrés Terán Mera, PhD.

C.I. 171656972-6

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Hoyos Caicedo Jhoni Javier, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink that reads "Jhoni Hoyos". The signature is stylized with a large initial 'J' and a horizontal line through the middle of the name.

Jhoni Javier Hoyos Caicedo

C.I. 180373304-5

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

PhD. Mario Daniel García Solís
C.I.: 110360547-1

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza
C.I.: 180316027-2

Ambato, 11 de enero del 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedemos los derechos en líneas patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jhoni Javier Hoyos Caicedo

C.I. 180373304-5

AUTOR

DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera, que me ha enseñado a ser perseverante y no rendirme ante los obstáculos que se presenten durante el camino.

A mi madre que siempre me brindó su apoyo en todas las situaciones, ha sido un pilar fundamental durante mi formación.

A mi padre por enseñarme los valores de la vida.

A mis hermanos que han sido un apoyo durante toda la carrera en lo académico y en muchos más aspectos.

AGRADECIMIENTO

Detrás de cada logro, existen muchas personas que han formado parte del camino para llegar al objetivo.

Agradezco a mis padres y mis hermanos por siempre brindarme su apoyo durante los momentos difíciles, gracias a ellos he llegado a donde estoy al momento. Les agradezco por los consejos y por la confianza.

Agradezco a mi familia en general que siempre ha estado pendiente de mis avances, y a sus palabras de apoyo y aliento.

Agradezco a mis amigos, ya que con ellos he compartido gran parte de mi vida durante mi época de estudios. He aprendido muchas cosas, a base de consejos y experiencia. Les agradezco por la confianza brindada durante toda la vida universitaria. Juntos compartimos gratos momentos en clases, en laboratorios y en muchas actividades.

Agradezco a las personas que me han apoyado durante la carrera y durante el desarrollo de mi trabajo de titulación, gracias a su apoyo incondicional y por darme ánimos para no decaer y seguir adelante.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv

CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1. Coronavirus.....	1
1.1.1.1. Estructura de los coronavirus.....	2
1.1.2. COVID-19.....	2
1.1.3. Virus del SARS-CoV-2.....	3
1.1.3.1. Estructura del virus del SARS-CoV-2.....	3
1.1.4. Receptor hACE 2.....	4

1.1.4.1.	Estructura del receptor hACE 2.....	5
1.1.4.2.	Funcionamiento del receptor hACE2 en la regulación de la presión 6	
1.1.5.	Mecanismo de patogénesis del SARS-CoV-2.....	8
1.1.6.	Interacción del receptor hACE2 con el virus SARS-CoV-2.....	9
1.1.7.	Bioinformática.....	12
1.1.7.1.	Docking molecular.....	13
1.1.7.2.	Acoplamiento molecular conjunto.....	14
1.1.7.3.	Acoplamiento molecular rígido	14
1.1.7.4.	Acoplamiento molecular flexible.....	15
1.1.7.5.	Algoritmo genético	15
1.2.	Objetivos	15
1.2.1.	Objetivo General:.....	15
1.2.2.	Objetivos Específicos:.....	16
1.3.	Hipótesis.....	16
1.3.1.	Hipótesis Nula.....	16
1.3.2.	Hipótesis Alternativa.....	16
1.4.	Variables	16
1.4.1.	Variables Dependiente:	16
1.4.2.	Variable Independiente:	16
CAPÍTULO II		17
METODOLOGÍA		17
2.1.	Materiales y equipos.....	17
2.1.1.	Materiales.....	17
2.1.2.	Equipos	17
2.2.	Métodos	18

2.2.1. Docking del receptor hACE2 contra las librerías de compuestos CASPeR, ChemBridge y Pathogen Box	18
2.2.1.1. Elaboración bibliotecas de ligandos	18
2.2.1.2. Preparación de la enzima convertidora de angiotensina 2 (hACE2) 19	
2.2.1.3. Docking en PyRx	20
2.2.2. Cálculo de Kdapp	21
2.2.3. Análisis de interacciones	21
2.2.4. Pipeline del proceso de docking	22
CAPÍTULO III	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1. Análisis y discusión de resultados	24
3.1.1. Análisis del mecanismo de unión del hACE2 CON SARS-CoV-2	24
3.1.2. Resultados del Docking Molecular	25
3.2. Verificación de hipótesis	50
CAPÍTULO IV	51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
4.1. Conclusiones	51
4.2. Recomendaciones	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de los coronavirus	2
Figura 2. Esquema de la estructura del SARS-CoV-2	4
Figura 3. Interacción del receptor hACE2 con el SARS-CoV- 2	6

Figura 4. Equilibrio de los ejes Ang-II y Ang (1-7).....	7
Figura 5. Ciclo de vida del SARS-CoV-2.....	9
Figura 6. Estructura del SARS-CoV-2 RBD unido a hACE2	10
Figura 7. Complejo hACE2/ SARS-CoV-2. En el rectángulo rojo se resalta la zona de los aminoácidos escogidos para realizar el docking	26
Figura 8. Zona activo para realizar el docking. Los aminoácidos se encuentran representados en color rosado	27
Figura 9. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 4SC-202 de la librería Drug.	34
Figura 10. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando AZD1480 de la librería Drug.	35
Figura 11. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando AZ 628 de la librería Drug.	36
Figura 12. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando Amuvatinib (MP-470) de la librería Drug.	37
Figura 13. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando NVP-BHG712 de la librería Drug.....	38
Figura 14. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando LOSARTAN de la librería Drug.....	39
Figura 15. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 1-(2-naphthoyl)-4-piperidinecarboxamide de la librería Fragment Library.	40
Figura 16. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 2-oxo-N-(2-pyridinylmethyl)-1,2-dihydro-4-quinolinecarboxamide de la librería Fragment Library.....	41
Figura 17. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 3-methyl-N-(3-pyridinylmethyl)-1-benzofuran-2-carboxamide de la librería Fragment Library.....	42
Figura 18. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 7-(4-fluorophenyl)-5-(3-pyridinyl)-4,5,6,7-tetrahydro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine de la librería Fragment Library.....	43

Figura 19. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando N-(2-amino-2-oxoethyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-6-carboxamide (non-preferred name) de la librería Fragment Library.	44
Figura 20. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando MMV688372 (KINETOPLASTIDS) de la librería Pathogen Box.....	45
Figura 21. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando MMV687246 (MALARIA) de la librería Pathogen Box.....	46
Figura 22. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando MMV016838 (MALARIA) de la librería Pathogen Box.....	47
Figura 23. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando MMV688178 (SCHISTOSOMIASIS) de la librería Pathogen Box.	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interacciones entre el hACE2 y el SARS-CoV-2	11
Tabla 2. Resultados de los ligandos con mejores interacciones con el receptor hACE2	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de los Binding Affinity de Drug (CASPeR).....	61
Anexo 2. Resultados de los Binding Affinity de Fragment Library (ChemBridge)..	67
Anexo 3. Resultados de los Binding Affinity de Pathogen Box.....	71

RESUMEN

Los estudios bioinformáticos realizados en la enzima convertidora de angiotensina 2 en humanos (hACE2) para el desarrollo de posibles inhibidores contra el virus del SARS-CoV-2, fueron principalmente docking molecular conjunto. El docking se basó en realizar interacciones entre ligandos pertenecientes a tres librerías.

Las librerías utilizadas fueron tres, CASPeR, ChemBridge y Pathogen Box. De cada librería se escogieron un grupo de compuestos para realizar el docking. De la librería CASPeR se escogieron a los compuestos denominados Drug (3517 ligandos), de la librería de compuestos ChemBridge se escogió a Fragment Library (10064 ligandos). Finalmente, los compuestos de Pathogen Box (400 ligandos), pertenecientes a Medicine For Malaria Venture.

La finalidad del presente estudio fue determinar los compuestos (ligandos) que tengan potencial de ser inhibidores del receptor hACE2. Tras el análisis de resultados mediante la afinidad de unión e interacciones intermoleculares, se encontraron a 15 ligandos con mejor interacción en el complejo enzima-ligando. Estos ligandos tienen potencial para ser inhibidores de una zona de sitio activo, ya que se realizó el docking en los aminoácidos Lisina- 31 (Lys-31), Glutamato- 35 (Glu-35), Aspartato- 38 (Asp-38) y Lisina- 353 (Lys-353).

El presente estudio tiene importancia ya que al haber realizado estudios de docking con diferentes ligandos, se pudieron obtener los que presentan mejor interacción. Los resultados obtenidos pueden ser usados para realizar estudios *in vitro* e *in vivo* con el virus.

Palabras clave: Bioinformática, docking molecular, inhibidores enzimáticos, modelado molecular, SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The bioinformatic studies carried out on human angiotensin converting enzyme 2 (hACE2) for the development of possible inhibitors against the SARS-CoV-2 virus, were mainly joint molecular docking. Docking was mainly based on detect interactions between ligands belonging to three libraries.

The libraries used were three, CASPeR, ChemBridge and Pathogen Box. From each library, a group of compounds were chosen for docking. From the CASPeR library, the compounds named Drug (3517 ligands) were chosen, from the ChemBridge compound library the Fragment Library (10064 ligands) were chosen. Finally, the Pathogen Box compounds (400 ligands), belonging to Medicine For Malaria Venture.

The purpose of the present study was to determine the compounds (ligands) that have the potential to be inhibitors of the hACE2 receptor. After analyzing the results by means of binding affinity and intermolecular interactions, 15 ligands with the best interaction were found in the enzyme-ligand complex. These ligands have the potential to be inhibitors of an active site zone, when docking in the amino acids Lysine-31 (Lys-31), Glutamate-35 (Glu-35), Aspartate-38 (Asp-38) and Lysine- 353 (Lys-353).

The present study is important since, having carried out docking studies with different ligands, it was possible to obtain those with the best interaction. The results obtained can be used to carry out in vitro and in vivo studies with the virus.

Key words: Bioinformatic, molecular docking, enzyme inhibitors, molecular modeling, SARS-CoV-2.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Coronavirus

Los coronavirus (CoVs) son una familia amplia de virus que causan diferentes afecciones que pueden ir desde un resfriado común hasta enfermedades respiratorias más graves. Uno de estos ejemplos es el coronavirus que fue causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el coronavirus que produce el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV). El coronavirus más reciente es el SARS-CoV-2, causante de la pandemia de COVID-19. Los diferentes coronavirus existentes se pueden transmitir de forma zoonótica (transmisión de animales a las personas). Existen más coronavirus que tienen los animales que todavía no han infectado al ser humano (OMS, 2020).

El síndrome respiratorio agudo severo (SARS) es un cuadro de neumonía que posee características clínicas y evolutivas atípicas. En el año 2002 se presentó el primer caso de esta nueva enfermedad y en el 2003, la OMS alertó acerca de la aparición de esta nueva neumonía severa, la cual se propagó a través de turistas internacionales produciendo un brote mundial (**Wu, 2003**).

Los virus se pueden clasificar en cuatro géneros: alfa, beta, gamma y deltaCoV. Los coronavirus humanos previamente identificados que causan enfermedades humanas son los los alphaCoVs hCoV-NL63, hCoV-229E, los betaCoVs HCoV-OC43, HKU1, el síndrome respiratorio agudo severo CoV (SARS-CoV) y el síndrome respiratorio de Oriente Medio CoV (MERS-CoV) (**Wevers & van der Hoek, 2009**). De todos los coronavirus mencionados, el SARS-CoV y el MERS-CoV pueden provocar enfermedades mortales y tienen potencial pandémico (**Wang et al., 2020**).

1.1.1.1. Estructura de los coronavirus

El coronavirus fue nombrado así por el prefijo *corona* que se refiere a las estructuras presentes en su superficie (García et al., 2003). Los coronavirus son un amplio grupo de virus que pertenecen taxonómicamente a la subfamilia Orthocoronavirinae dentro de la familia Coronaviridae. Su estructura se trata de virus esféricos de 100- 160 nm de diámetro con una envoltura de ARN con aproximadamente 30000 pb, con una capucha metilada en el extremo 5' y una cola poli- A en el extremo 3' (Oliva, 2020).

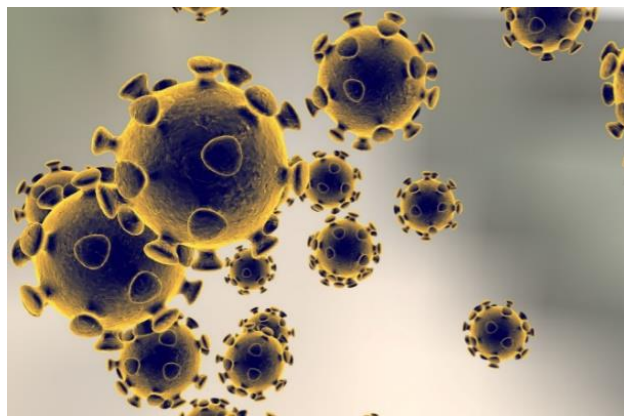


Figura 1. Morfología de los coronavirus (Farmacéuticos, 2020)

1.1.2. COVID-19

COVID-19 (Coronavirus 2019) es la denominación que tiene la enfermedad causada por el virus del SARS-CoV-2, el cual provocó el brote de esta enfermedad en el año 2019. La enfermedad se originó en Wuhan, China y se lo relacionó con un mercado de animales vivos y al ser una enfermedad que se transmite de forma zoonótica, empezó el contagio. La propagación entre personas subió de una manera descontrolada, siendo declarada como pandemia al registrar contagios en todas las regiones del mundo (Díaz & Toro, 2020; Farmacéuticos, 2020).

1.1.3. Virus del SARS-CoV-2

El síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (SARS-CoV-2) es el virus causante de la enfermedad del COVID-19. Es un tipo de coronavirus zoonótico, que usa a los mamíferos (animales) como hospedadores intermediarios para transmitir el virus a los humanos, un ejemplo de animales que sirven de hospedadores son los murciélagos, donde se permite la recombinación con mayor facilidad y permite tener mayor diversidad genética de los virus (Oliva, 2020).

El SARS-CoV-2 es el séptimo coronavirus que causa enfermedades humanas y pertenece a la familia de los betacoronavirus y está muy relacionado con el SARS-CoV. De la misma forma que otros coronavirus, la proteína S es la responsable de que se una al receptor en los humanos (hACE2) y así unirse a la célula hospedera para desarrollarse (Wang et al., 2020; Xiong et al., 2020).

Según estudios filogenéticos realizados, se habla que el SARS-CoV-2 se originó en los murciélagos y pudo haber contagiado a los humanos posiblemente mediante el pangolín en un mercado de animales vivos en Wuhan (Oliva, 2020).

Para que el SARS-CoV-2 pueda ingresar a la célula del hospedero es necesario que se una a la enzima convertidora de angiotensina en humanos (hACE2), este modo de unión es similar al del SARS-CoV ya que usan el mismo receptor de la célula huésped (Lan et al., 2020).

1.1.3.1. Estructura del virus del SARS-CoV-2

El genoma del SARS-CoV-2 codifica 4 proteínas estructurales del virus: la proteína S (spike), la proteína E (envelope), la proteína M (membrane) y la proteína N (nucleocapsid), de todas estas estructuras, la proteína S es la que permite la unión al receptor hACE2 (Rabi et al., 2020).

La proteína S del SARS-CoV-2 se compone de dos subunidades en la envoltura: la subunidad 1 (S1) y la subunidad 2 (S2), estas subunidades permiten unirse a los receptores celulares del huésped. Al unirse las subunidades de la proteína S con el receptor hACE2, se produce una fusión entre las membranas celular y viral (Tolosa, 2020). La subunidad S1 permite

la unión directa con el receptor hACE 2 mientras que la subunidad S2 se encarga de la fusión de membranas para permitir la infección viral. La subunidad S1 se puede dividir en un dominio N- terminal (NTD) y un dominio C- terminal (CTD), estos dos dominios se acoplan al receptor de la célula huésped y se convierten en dominios de unión al receptor (RBD), el cual contiene un núcleo y motivos de unión al receptor (RBM) y son encargados de mediar los contactos con hACE2 (Walls et al., 2020).

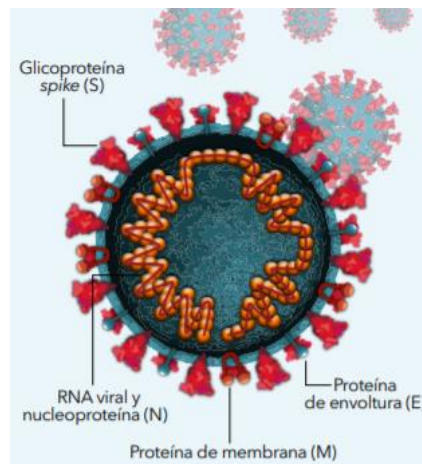


Figura 2. Esquema de la estructura del SARS-CoV-2 (Díaz & Toro, 2020)

1.1.4. Receptor hACE 2

La enzima convertidora de angiotensina 2 (hACE2) es una aminopeptidasa asociada a la membrana que se expresa en el endotelio vascular, el tejido renal, tejido cardiovascular, el epitelio del intestino delgado y los testículos (Jia et al., 2005). La hACE2 actúa como regulador de los niveles de angiotensina 2 en el cuerpo, es una metaloenzima de zinc y una carboxipeptidasa ubicada como una ectoenzima en la superficie de las células endoteliales y otras. También tiene otras funciones como receptor del SARS-CoV y SARS-CoV-2 (Li et al., 2005; Turner, 2015). Actúa en la transformación de la angiotensina I en angiotensina 1-9 (inactivo) y de la angiotensina II en la angiotensina (1-7). El receptor hACE2 tiene un sitio activo diferente al de la proteína S del SARS-CoV-2, ya que cada estructura presenta residuos específicos para su actividad (Díaz & Toro, 2020).

La principal función de la hACE2 es la maduración de la angiotensina, una hormona peptídica que controla la vasoconstricción y la presión arterial, la expresión disminuida de la hACE2 se asocia con enfermedades cardiovasculares. La hACE2 puede reducir la presión al catalizar la hidrólisis de la angiotensina II (vasoconstrictor) en angiotensina (1-7) (vasodilatador). También tiene la función de ser chaperona para el tráfico de membrana del transportador de aminoácidos (**Yan et al., 2020**).

1.1.4.1. Estructura del receptor hACE 2

La hACE2 contiene un dominio de peptidasa (PD) N-terminal y un dominio de colectrina (CLD) C-terminal que termina con una hélice transmembrana y un segmento intracelular de alrededor de 40 residuos. El dominio de la peptidasa tiene una estructura similar a una garra con dos lóbulos (**Yan et al., 2020**). El sitio activo enzimático de hACE2 está enterrado en una cavidad profunda entre los dos lóbulos (Li, 2013).

Una región de la porción extracelular de hACE2 que incluye la primera hélice α y lisina 353 y los residuos proximales del extremo N de la hoja β 5 interactúa con alta afinidad por el dominio de unión al receptor de la glicoproteína SARS-CoV (**Jia et al., 2005**).

La hACE2 es un receptor crucial para la infección del SARS-CoV y SARS-CoV-2, para esto, la unión de la proteína SARS-CoV-2 al receptor hACE2 modula la baja expresión de hACE2 y la pérdida o disminución de esta expresión provoca la insuficiencia respiratoria aguda grave. La superficie del receptor hACE2 contiene dos puntos de anclaje al virus que son esenciales para la unión del SARS-CoV-2 (**Kuba et al., 2005**).

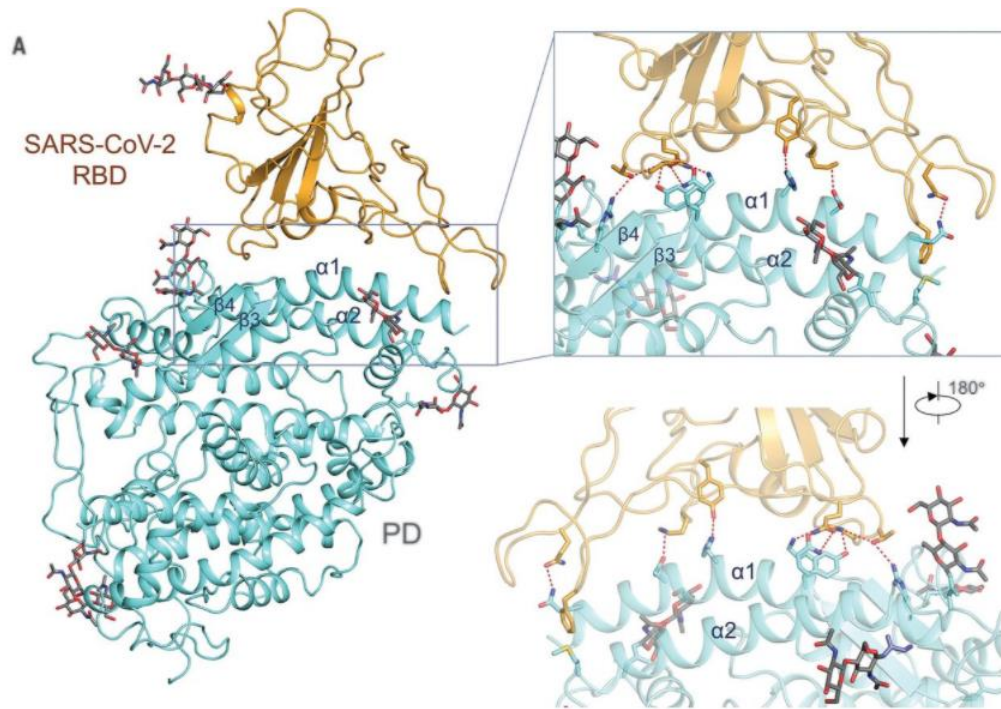


Figura 3. Interacción del receptor hACE2 con el SARS-CoV- 2 (Yan et al., 2020)

1.1.4.2. Funcionamiento del receptor hACE2 en la regulación de la presión

La angiotensina II se forma a partir de la angiotensina I mediante la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). La angiotensina I es inactiva, y su función es ser convertida en angiotensina II (Díaz & Toro, 2020).

El funcionamiento de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) se encuentra conectado al sistema renina- angiotensina- aldosterona (RAAS). Este sistema es una cascada proteolítica donde intervienen la angiotensina I y la angiotensina II. El RAAS tiene gran relevancia en la fisiología humana ya que es un regulador de importancia en el control de la presión arterial. Se encuentra directamente relacionado con los problemas de presión y enfermedades cardiovasculares (Keidar et al., 2007; Soler et al., 2008).

El RAAS inicia con la producción de angiotensina, lo cual se lleva a cabo mediante la hidrólisis de angiotensinógeno por parte de la renina para obtener la angiotensina I (Ang-I). El papel de la ACE es eliminar dos aminoácidos del extremo carboxilo de la Ang-I para obtener angiotensina II (Ang-II) (Keidar et al., 2007). La Ang-II también se puede producir en algunos tejidos, en vasos sanguíneos, riñones, corazón y cerebro

mediante vías que no dependen de la ACE (vía de la quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G) (Santeliz et al., 2008). Una vez obtenida la Ang-II, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) es la encargada de la formación de la angiotensina (1-7) [Ang (1-7)] (Wagner, 2018).

La Ang-II tiene la función de vasoconstrictor, mientras que la Ang (1-7) realiza una función antagonista, siendo vasodilatador. Para que se pueda realizar esta regulación, intervienen los receptores tipo 1 (AT1R) y tipo 2 (AT2R) (Chamsi-Pasha et al., 2014). La unión de Ang-II con AT1R media la vasoconstricción, mientras que la unión de la unión de Ang-II con AT2R logra contrarrestar los efectos causados por AT1R. en personas adultas se da una alta expresión de AT1R, lo cual provoca ser propenso a enfermedades cardiovasculares o problemas de presión arterial (Pastrian-Soto, 2020).

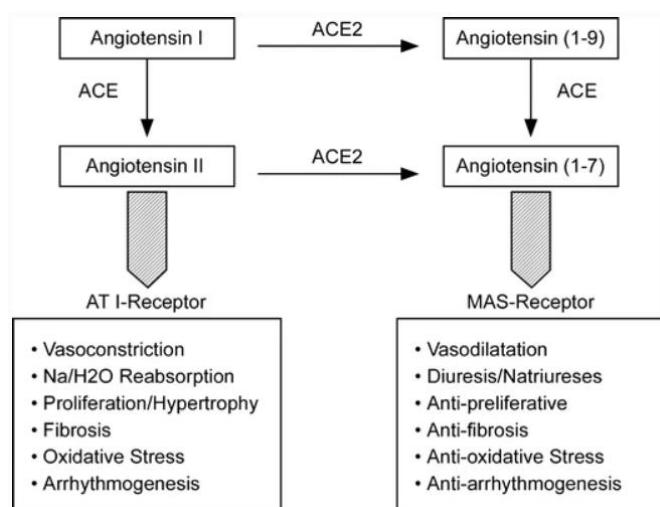


Figura 4. Equilibrio de los ejes Ang-II y Ang (1-7) (Chamsi-Pasha et al., 2014)

La enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) tiene un papel fundamental en la fisiología cardiovascular. Posee una acción reguladora en el sistema RAAS, ya que ayuda a mantener una homeostasis en dicho sistema. Cuando existe una función anormal del sistema RAAS, se puede utilizar a inhibidores de Ang-II, los cuales son medicamentos usados en el área de cardiología para el tratamiento de hipertensión e insuficiencia cardíaca (Pastrian-Soto, 2020).

Existen diversas formas para el tratamiento de los problemas de salud causados por Ang-II. Entre algunas formas de contrarrestar este efecto negativo, se encuentra el

bloqueo de la Ang-II y el bloqueo del AT1R. El bloqueo del AT1R, puede provocar la concentración de Ang-II y a su vez puede influir el AT2R, lo que provoca el aumento de Ang (1-7) reduciendo los problemas cardiovasculares y de hipertensión (**Keidar et al., 2007**).

Existen medicamentos como irbesartán, losartán, telmosartán, valsartán y eprosartán que son usados ampliamente en el tratamiento de problemas de hipertensión. El primer derivado de los antagonistas de los receptores AT1R es el losartán. Este fármaco es una sustancia sintética que compite con AT1R, debido a su parecido estructural con este receptor de la Ang-II (**Contreras et al., 2000**).

1.1.5. Mecanismo de patogénesis del SARS-CoV-2

La proteína spike del SARS-CoV-2 tiene dos subunidades, la subunidad S1 y S2. La subunidad S1 se une al receptor hACE2 mediante el dominio de unión al huésped (RBD) y la subunidad S2 se encarga de la fusión de las membranas (de la célula huésped y del virus) (**Pastrian-Soto, 2020**).

Una vez que se la proteína del spike se une al receptor hACE2, este complejo es procesado por la proteasa transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), realizando una escisión de hACE2, a su vez se activa la proteína del spike. Con el ingreso del virus a la célula, la nucleocápside libera el ARN genómico viral. Se realiza la formación de poliproteínas 1a y 1ab, posteriormente se da la transcripción del genoma viral. La glicoproteínas de envoltura formadas recientemente, se insertan en el aparato de Golgi (**Oliva, 2020**). Posteriormente, el ARN mensajero y las proteínas de nucleocápside, forman viriones mediante su combinación, para la obtención de nuevas partículas virales que emergen en el compartimiento intermedio retículo endoplasmático- Golgi. En este punto, se tienen vesículas con los viriones formados y migran hacia la membrana plasmática celular donde se fusionan para formar las partículas virales completas. Posteriormente, estas partículas virales completas son liberadas por la célula para infectar a nuevas células en ciclos repetitivos y así liberar el virus (**Pastrian-Soto, 2020; Rabi et al., 2020**).

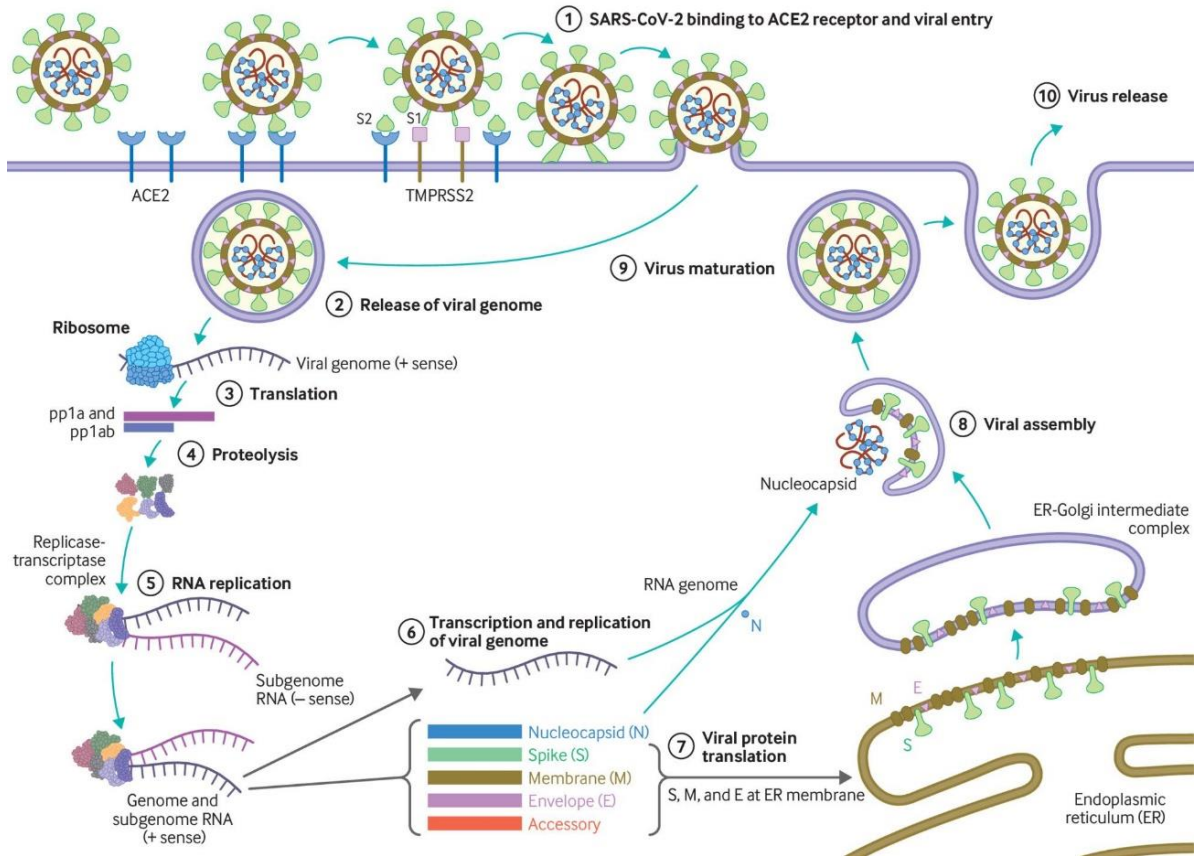


Figura 5. Ciclo de vida del SARS-CoV-2 (Cevik et al., 2020)

1.1.6. Interacción del receptor hACE2 con el virus SARS-CoV-2

La infección del virus inicia con la unión de partículas virales a los receptores del huésped (proteína S del SARS-CoV-2 con el receptor hACE2). El reconocimiento de receptores por parte del virus es fundamental en el tropismo celular y tisular del virus. En los coronavirus, el proceso de entrada a la célula huésped está determinado y mediado por la glicoproteína S, que se encuentra ubicada en la superficie incrustada de la envoltura, generalmente la glicoproteína S es separada por proteasas de la célula huésped en las subunidades S1 y S2, las cuales son responsables de reconocimiento del receptor y la fusión de la membrana, respectivamente (Wang et al., 2020).

En una comparación entre los complejos SARS-CoV RBD/hACE2 y SARS-CoV-2 RBD/hACE2 se entiende la razón por la que SARS-CoV-2 tiene una mejor unión a hACE2 que SARS-CoV y por lo tanto es más infectiva, provocando mayores daños a la célula huésped. SARS-CoV-2 RBM forma un sitio de unión más grande y con mayor contacto con hACE2 que SARS-CoV RBM ya que esta forma puentes salinos más

débiles, pero es más favorable energéticamente. SARS-CoV y bat-CoV Rs3367 contienen un motivo con tres residuos Pro-Pro-Ala en dicho lazo; pero en SARS-CoV-2 y bat-CoV RaTG13 muestran un motivo de cuatro residuos Gly-Val/Gln-Glu/Thr-Gly; así la conformación del bucle cambia gracias a que las glicinas son más flexibles, y esto favorece la unión RBD/hACE2. También la cresta tiene una conformación más compacta debido a los puentes de hidrógeno Asn487 y Ala475 en SARS-CoV-2 RBM (Figura 4) (Shang et al., 2020).

El SARS-CoV-2 tiene una hoja β antiparalela de cinco hebras retorcidas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 7$) con hélices y bucles de conexión cortos que forman el núcleo. Entre las hebras $\beta 4$ y $\beta 7$ en el núcleo, hay una inserción extendida que contiene las hebras cortas $\beta 5$ y $\beta 6$, hélices y bucles $\alpha 4$ y $\alpha 5$. Esta inserción extendida es el RBM, que contiene la mayoría de los residuos de contacto del SARS-CoV-2 que se unen a hACE2. En el RBD se encuentran un total de nueve residuos de cisteína, ocho de los cuales forman cuatro pares de enlaces disulfuro que se resuelven en el modelo final. Entre estos cuatro pares, tres están en el núcleo (Cys336 – Cys361, Cys379 – Cys432 y Cys391 – Cys525), estabilizan la estructura de la hoja β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 7$), el par (Cys480-Cys488) es fundamental para la unión de la cresta del SARS-CoV-2 RBM y la hélice N-terminal del hACE2 (Lan et al., 2020).

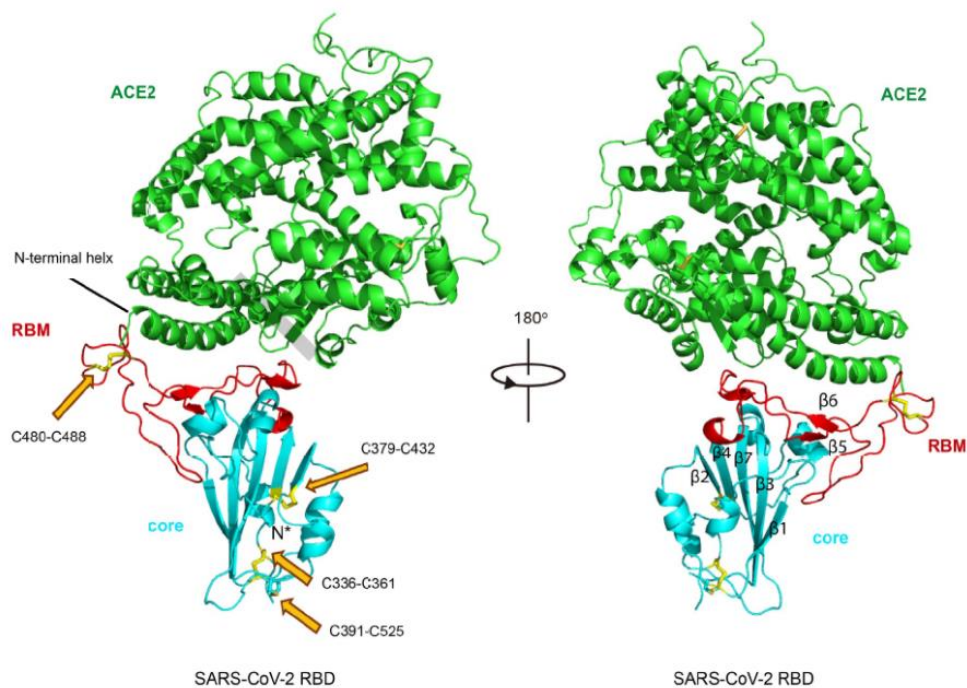


Figura 6. Estructura del SARS-CoV-2 RBD unido a hACE2 (Lan et al., 2020)

Tabla 1. Interacciones entre el hACE2 y el SARS-CoV-2 (*Adaptada de Wang et al, 2020*)

hACE2		SARS-CoV-2-CTD					
aa	vdw	aa	vdw	PH	aa	vdw	PH
S19	7	A475	3	1	G476	4	-
Q24	24	A475	4	-	G476	5	-
		N487	15	1			
T27	15	F456	5		Y473	1	
		A475	2		Y489	7	
F28	7	Y489	7				
D30	10	K417	4	1	L455	2	
		F456	4				
K31	19	L455	2		F456	5	
		E484	1		Y489	6	
		F490	2		Q493	3	
H34	20	Y453	5	1	L455	9	
		Q493	6				
E35	8	Q493	8				
E37	7	Y505	7				
D38	15	Y449	9	1	G496	5	
		Q498	1				
Y41	23	Q498	8		T500	7	1
		N501	8	1			
Q42	16	G446	4	1	Y449	4	1
		Q498	8	3			
L45	4	Q498	3		T500	1	
L79	2	F486	2				
M82	9	F486	9				
Y83	20	F486	11		N487	8	1
		Y489	1				
Q325	0	-					
E329	0	-					
N330	8	T500	8				
K353	50	G496	7	1	N501	11	
		G502	4	1	Y505	28	
G354	11	Y502	7		Y505	4	
D355	9	T500	8	1	G502	1	
R357	3	T500	3				
R393	1	Y505	1				

*aa: Aminoácido; vdw: Van der Waals; PH: Puente de Hidrógeno

En el estudio de **Wang et al (2020)**, se analizó la base estructural de la interacción del virus con el receptor, para ello se preparó el complejo SARS-CoV-2 mediante la mezcla *in vitro* de las dos proteínas y complejos aislados mediante cromatografía por exclusión de tamaño. En la estructura compleja formada, el SARS-CoV-2 tiene 195 residuos consecutivos de densidad rastreable que van desde T333 a P527. Se realizó un análisis para la identificación de los residuos clave involucrados en la formación

del complejo. Se adicionaron los aminoácidos ubicados dentro de la distancia de contacto de Van der Waals (vdw) entre el ligando viral y el receptor y se encontró que una serie de residuos hidrofílicos ubicados a lo largo de la interfaz formaban un sólido red de interacciones de puentes salinos y puentes de hidrógeno, estas fuertes uniones polares engloban el residuo A475 de SARS-CoV-2-CTD que interactúa con el residuo de hACE2 S19, N487 con Q24 E484 con K31 e Y453 con H34.

Existen más contactos de virus-receptor que incluyen el empaquetamiento de SARS-CoV-2-CTD Y489 y F486 contra los residuos de hACE2 F28, L79, M82 e Y83, formando un pequeño parche de interacciones hidrofóbicas en la interfaz. La interacción virus-receptor está dominada por contactos polares mediados por residuos hidrofílicos (**Wang et al., 2020**).

1.1.7. Bioinformática

La bioinformática es una rama que nace de la interacción entre la biología, la estadística y las ciencias de la informática, con los objetivos principales del manejo de grandes volúmenes de datos. Existen varias herramientas dentro de la bioinformática, uno de ellos es el acoplamiento molecular o docking (**Gómez et al., 2010**).

Actualmente la bioinformática se ha convertido en un pilar fundamental en el estudio de seres vivos, sus mecanismos de acción y estudios de inhibición para el desarrollo de nuevas moléculas o fármacos. El estudio de la bioinformática se ha extendido al desarrollo de nuevas metodologías para el desarrollo de nuevo conocimiento (**Martínez, 2007**).

La bioinformática tiene diferentes aplicaciones, dentro de las cuales se encuentran la gestión, la simulación y el análisis de la información de interés, también se puede realizar la predicción de estructuras proteicas. La simulación se refiere a realizar experimentos con un modelo partiendo de hipótesis, para entender la estructura y su funcionalidad para realizar alguna predicción de la estructura con algún ligando (**Coltell et al., 2008**).

1.1.7.1. Docking molecular

También conocido como acoplamiento molecular, se desarrolló inicialmente a partir de 1982, desde entonces se ha tomado en cuenta como fundamento central del cribado virtual basado en estructuras moleculares (**Berry et al., 2015**) y es el estudio de cómo dos o más estructuras moleculares, encajan entre sí, en otras palabras, el acoplamiento molecular es una técnica de modelado molecular que se emplea para predecir cómo una proteína (enzima) interactúa con pequeñas moléculas denominadas ligandos (**Roy et al., 2015**). Es una forma simplificada de simulación de dinámicas moleculares utilizando diversos software, estos estudios se denominan *in silico* (**Zheng et al., 2019**). Se emplea para obtener una predicción de la estructura del complejo ligando-receptor mediante métodos de cálculo (**Meng et al., 2011**).

El acoplamiento es una técnica de modelado molecular diseñada para encontrar el ajuste adecuado entre un ligando y su sitio de unión (receptor). Una molécula de ligando puede unirse con un receptor en múltiples posiciones, conformaciones y orientaciones. Cada uno de estos modos de acoplamiento se llama postura de acoplamiento. Un receptor es una molécula de proteína o una estructura polimérica en o sobre una célula que reconoce y une distintivamente una molécula (ligando) que actúa como un mensajero. Cuando tales ligandos se unen a un receptor, causan que algún tipo de célula respuesta. Un ligando es la molécula complementaria de la pareja que se une al receptor para una respuesta biomolecular efectiva. Los ligandos suelen ser pequeñas moléculas de fármacos, neurotransmisores, hormonas, linfoquinas, lectinas y antígenos, pero podrían también ser otro biopolímero o macromolécula. (**Roy et al., 2015**).

Se basa en dos pasos principales, en donde se utilizan dos algoritmos diferentes. En primer lugar, se emplea el algoritmo de muestreo, el cual predice las conformaciones que el ligando puede asumir en el punto de unión entre el ligando y el receptor, denominadas poses. Posteriormente, la función de puntuación predice las energías de unión entre el ligando y el receptor para cada pose predicha. Luego las posturas de unión identificadas se ordenan en función de sus energías de unión, en donde la postura mejor clasificada debe corresponder a la conformación correcta del ligando, por lo que las funciones de puntuación pueden filtrar grandes bases de datos de estructuras moleculares (**Berry et al., 2015**).

Una vez finalizado el docking, todos los ligandos se clasifican en consecuencia por sus respectivas puntuaciones de acoplamiento (sus afinidades previstas), es decir, según los resultados del docking, los ligandos se clasifican según su interacción favorable con el receptor **(Roy et al., 2015)**.

Existen diferentes aplicaciones del acoplamiento molecular, como realizar predicciones de la afinidad de unión entre proteínas y ligandos. Esta técnica es de gran importancia para el descubrimiento de nuevos fármacos mediante el uso de tecnología e inteligencia artificial. Para realizar estas predicciones de afinidad, es necesario llevarlas a cabo en dos etapas las cuales son acoplar la molécula de interés y predecir la fuerza con la que esta molécula se une al objeto de estudio **(Ballester & Mitchell, 2010)**.

1.1.7.2. Acoplamiento molecular conjunto

El acoplamiento conjunto brinda la ventaja de permitir el acoplamiento de librerías con múltiples ligandos para realizar las simulaciones. Pueden existir múltiples conformaciones de la molécula de interés, también pueden existir múltiples conformaciones de los ligandos que van a interactuar con la molécula de interés. También existe el acoplamiento flexible del receptor, el cual limita los estudios, ya que únicamente permite la incorporación de un ligando para la simulación **(Ballón & Grados, 2019)**.

Existen ventajas al realizar el acoplamiento molecular conjunto, entre las más importantes se encuentra realizar simulaciones con más ligandos, ampliando así la posibilidad de obtener moléculas que presenten mejor interacción entre sí **(B-Rao et al., 2009)**.

1.1.7.3. Acoplamiento molecular rígido

Este tipo de acoplamiento molecular realiza simulaciones de los diferentes ligandos con la molécula de interés. Cada ligando tiene diferentes conformaciones mientras que la molécula de interés se encuentra rígida y en cada simulación realizada, los ligandos tratan de unirse al receptor para encontrar una conformación más estable. En este

método se superponen varias conformaciones de los ligandos o se puede utilizar un promedio de las dichas conformaciones, lo cual reduce el tiempo y costo de los análisis (Prieto & Medina, 2018; Totrov & Abagyan, 2008).

1.1.7.4. Acoplamiento molecular flexible

El acoplamiento molecular flexible presenta más opciones para realizar el análisis. En este tipo de acoplamiento también se generan diferentes conformaciones de la molécula de interés, ya que esta se mueve mientras interactúa con los ligandos hasta encontrar una estabilidad energética. Debido a estas variantes el análisis conlleva más tiempo y más recursos (B-Rao et al., 2009).

1.1.7.5. Algoritmo genético

Son estrategias que se usan para resolver ciertos problemas que están basados en el proceso genético de organismos vivos. Esta estrategia permite encontrar soluciones para problemas reales, para lo cual se trabaja con una población donde cada individuo de dicha población representa una posible solución al problema (Gescal, 2013).

El algoritmo genético es la estrategia que se utiliza para realizar el docking, mediante el cual se realizan las interacciones de la macromolécula y los ligandos tratando de encontrar las mejores y así obtener resultados viables. El acoplamiento molecular es una forma simplificada de simulación de dinámicas moleculares, ya que se realizan interacciones con la macromolécula rígida permitiendo que los ligandos interactúen para formar el complejo más estable (Zheng et al., 2019).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General:

- Analizar la enzima convertidora de angiotensina 2 en humanos (hACE2) como receptor de ligandos para el desarrollo de posibles inhibidores contra el SARS-CoV-2.

1.2.2. Objetivos Específicos:

- Analizar datos estructurales y funcionales del ingreso de SARS-CoV-2 al humano mediante el receptor hACE2 para el conocimiento del mecanismo de acción.
- Realizar estudios de Docking con el receptor hACE2 contra las librerías CASPeR, ChemBridge y Pathogen Box.
- Identificar los inhibidores que tengan mejor interacción con el receptor hACE2 para su inactivación.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis Nula

Los estudios informáticos de la enzima convertidora de angiotensina en humanos (hACE2) para el desarrollo de posibles inhibidores contra el SARS-CoV-2 no son factibles, por lo tanto, no se encontraron posibles inhibidores del virus.

1.3.2. Hipótesis Alternativa

Los estudios informáticos de la enzima convertidora de angiotensina en humanos (hACE2) para el desarrollo de posibles inhibidores contra el SARS-CoV-2 son factibles, por lo tanto, se encontraron posibles inhibidores del virus.

1.4. Variables

1.4.1. Variables Dependiente:

Inhibidores de las bibliotecas CASPeR, ChemBridge y Pahtogen Box.

1.4.2. Variable Independiente:

- Programas informáticos (PyMol, Instan Jchem, MarvinScketh, AutoDock, PyRx, CCP4MG).
- Archivos pdb, pdbqt.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales y equipos

2.1.1. Materiales

- Software para bioinformática:
 - PyMOL
 - CCP4MG
 - PyRx
 - InstantJChem
 - MarvinSketch
 - MarvinView
 - AutoDockTools 1.5.6
 - BIOVA Discovery Studio 2020
 - Protein Data Bank

- Archivo PDB:
 - 6LZG (secuencia A- hACE2)

- Librerías de ligandos:
 - Drug (CASPeR)
 - Fragment Library (Chembridge)
 - Pathogen Box

2.1.2. Equipos

- Computadora personal

2.2. Métodos

2.2.1. Docking del receptor hACE2 contra las librerías de compuestos CASPeR, ChemBridge y Pathogen Box

Para los estudios de Docking Molecular de las librerías en estudio, se realizó en dos partes. Inicialmente se elaboraron las bibliotecas de ligandos y se realizó un tratamiento de preparación a la macromolécula (hACE2). La segunda parte se basó en el docking de los compuestos de cada librería contra el receptor hACE2 (**Hernández, 2019**).

2.2.1.1. Elaboración bibliotecas de ligandos

Se elaboraron tres bibliotecas de ligandos, una de cada librería. En la librería de CASPeR se trabajó con Drug, en la librería de Chembridge se trabajó con Fragment Library, mientras que Pathogen Box fue la última librería trabajada.

Los compuestos trabajados con Drug fueron 3517, con Fragment Library fueron 10064, y con Pathogen Box fueron 400.

Para poder elaborar las bibliotecas de ligandos, se descargó cada una en formato CSV. Este archivo se transformó a formato SDF en el programa InstantJChem previo a la corrida del docking, donde:

- Se importó el archivo en formato CSV.
- Cuando se terminó de importar, se generó una tabla donde se encuentra toda la información de los ligandos de cada librería, como estructura, peso molecular, nombre comercial. En este punto se modificó la información de acuerdo con los requerimientos del estudio.
- Una vez modificada la tabla, se exportó a formato SDF.

2.2.1.2. Preparación de la enzima convertidora de angiotensina 2 (hACE2)

La macromolécula se trató mediante el programa AutoDock y su interfase visual AutoDockTools. Inicialmente se minimizó la energía de la macromolécula, para lo cual se añadieron los hidrógenos polares, se eliminaron moléculas de agua y cualquier metal que se encontró en la estructura:

- Se descargó el archivo PDB desde el Protein Data Bank de la proteína (en este caso el complejo que forma el receptor hACE2 con el SARS-CoV-2 que tiene el código 6LZG). En el complejo la subunidad A es de interés ya que esta pertenece al receptor hACE2. La subunidad B se descartó.

Se importó el archivo pdb al programa AutoDock Tools, mediante el menú “File” en la opción “Read Molecule” y se creó una carpeta con el nombre de la proteína en la sección “All Molecules”.

Para la eliminación moléculas que no son de interés, iones metálicos, moléculas de agua se realizó lo siguiente:

- Se seleccionaron las moléculas a eliminar, iones metálicos y en la opción “Edit” se seleccionó “Delete” y seguidamente “Delete Selected Atoms”. En este caso también se eliminó la subunidad B de la macromolécula.
- Para eliminar las moléculas de agua en “Edit” se seleccionó la opción “Delete Water”.
- Para añadir los hidrógenos con contactos polares se escogió la opción “Edit”, en “Hydrogens” se seleccionó “Merge Non-Polar”.
- Para añadir cargas a la subunidad deseada se escogió en el menú “Edit” la opción “Charge” y “All Kollman Charges”.
- Se realizó el Grid de la macromolécula, para lo cual se escogió el menú con el mismo nombre.

Finalmente se guardó la macromolécula en formato PDBQT, para lo cual en el menú “Macromolecule” se seleccionó a la macromolécula de interés (6LZG_A). este archivo se usó para realizar el docking del receptor hACE2 contra las librerías de compuestos tratadas.

2.2.1.3. Docking en PyRx

Para el proceso de docking en PyRx se realizó con cada librería por separado.

Se importó la librería elaborada en InstantJChem, mediante la opción “File” e “Import” y se seleccionó la librería deseada para realizar el docking.

Una vez que se terminó de importar, los compuestos se visualizaron en la sección “Wizard/Shell” en la pestaña “Open Babel”.

- Se minimizó la energía de los compuestos mediante la opción “Minimize All”.
- Se convirtió los compuestos en ligandos mediante la opción “Convert All to AutoDock Ligand (pdbqt)”.

Se añadió la macromolécula mediante el menú “File” y opción “Load Macromolecule”, donde se seleccionó el archivo generado en AutoDockTools en formato PDBQT.

- Una vez que se cargó el archivo de la macromolécula, se convirtió la macromolécula para usarla en el docking. Mediante clic derecho en el archivo se selecciona “AutoDock” y la opción “Make Macromolecule”.

En la pestaña Autodock/ Navigator, se visualizó la macromolécula dentro de la carpeta “Macromolecules” y los ligandos dentro de una carpeta con nombre “Ligands”.

Con la macromolécula y los ligandos listos se realizó el docking:

- Para iniciar el docking en la sección “Wizard/Shell” se escogió “Vina Wizard” se dio clic en “Start”.
- Se seleccionó la macromolécula y los ligandos y posteriormente se seleccionó la opción “Forward”.
- Se realizó el Autogrid, lo cual consistió en realizar una selección del sitio específico donde se realizará el docking. Este sitio es donde se encuentran los aminoácidos de interés.
- Se inició el docking dando clic en “Run Vina”.

- Una vez terminado el docking, se visualizan los resultados en la pestaña “Analyze Result”. Los resultados se ordenaron de acuerdo con la afinidad y se guardaron en formato CSV.
- Se crearon archivos en formato pdbqt de las interacciones macromolécula-ligando, en la carpeta “Macromolecules”.

Para el análisis de las estructuras, se guardaron en formato pdb las interacciones del complejo macromolécula-ligando.

Se realizó el mismo procedimiento con las tres librerías en estudio, obteniendo así las interacciones de los ligandos con la macromolécula.

2.2.2. Cálculo de K_{dapp}

Para el análisis, comparación de resultados y elección de los mejores inhibidores, se utilizó la energía de Gibbs.

Para el cálculo de la K_{dapp} se utilizó la fórmula de energía de Gibbs manteniendo las condiciones estándares a las que trabaja el receptor hACE2.

$$-\Delta G = RT \ln(K_{dapp})$$

Donde:

$T=310,15$ K

$R=1.987207$ cal/mol*K

$-\Delta G$ = Energía obtenida en el docking

2.2.3. Análisis de interacciones

Para realizar el análisis de las interacciones de los ligandos con el receptor hACE2, se utilizó el software BIOVA Discovery Studio 2020.

Una vez obtenidas las estructuras de las interacciones en formato pdb, se visualizaron en el software para la determinación de todas las interacciones.

- En el software BIOVA Discovery Studio 2020, inicialmente se cargó la macromolécula en formato pdb mediante el menú “File” y “Open”.
- Mediante el mismo procedimiento se cargó el archivo de cada ligando de interés, en formato pdb.
- En el interfaz visual, se visualizaron las dos estructuras. Se eligió la pestaña “Receptor-Ligand Interactions” y en el cuadro de diálogo ubicado en la izquierda de la pantalla, existen varios parámetros para interactuar con el software.
- Se seleccionó la opción de “Ligand Interactios” e inmediatamente se visualizaron las interacciones que tiene el ligando con la macromolécula. Cada interacción se diferencia de las demás mediante colores.
- Las interacciones se muestran entre el ligando y los aminoácidos de la macromolécula con los que interactúan.
- Para identificar mejor cada elemento, se colocó etiquetas a los aminoácidos. Para realizar esto, en la interfaz mediante clic derecho se seleccionó “Label”.
- En el cuadro ubicado en la izquierda de la pantalla, se puede seleccionar una visualización en 2d.
- Para guardar las imágenes de las interacciones, en el menú “File” se escoge la opción “Save As” y en el tipo de elemento se escogió imagen.

2.2.4. Pipeline del proceso de docking

Para realizar el docking utilizando como macromolécula al receptor hACE2 y como ligandos (inhibidores) a los compuestos de las bibliotecas mencionadas anteriormente, se debe seguir el siguiente protocolo (pipeline):

- Para realizar un docking molecular es necesario realizar un tratamiento a las bibliotecas de ligandos y a la macromolécula y el proceso de docking.
- Descargar las bibliotecas de ligandos de las respectivas páginas web en formato csv.
- Realizar el tratamiento en el programa InstantJChem para transformar a formato sdf.

- La macromolécula también recibirá un tratamiento en AutoDockTools, donde se minimizará la energía, se añadirán hidrógenos, se eliminarán moléculas de agua, metales y las moléculas que no son de interés.
- Realizar el Grid para obtener finalmente la macromolécula en formato pdbqt.
- Para realizar el proceso del docking en PyRx, importar las librerías de ligandos en formato sdf.
- Minimizar la energía de las librerías de los ligandos y convertirlas a formato pdbqt.
- Añadir la macromolécula en formato pdbqt y convertirla para poder usarla en el docking.
- Para realizar el docking, se debe seleccionar los ligandos y la macromolécula de interés.
- Realizar el autogrid, el cual consiste en seleccionar el sitio específico de la macromolécula donde se requiere realizar el docking.
- Seleccionar los parámetros requeridos para realizar el docking.
- Correr el docking y analizar los resultados obtenidos mediante la energía de Gibbs.
- Guardar los complejos enzima- ligando que mostraron mejores resultados para su posterior análisis.
- Analizar todos los resultados obtenidos y seleccionar los mejores inhibidores (ligandos).
- Analizar las interacciones intermoleculares que tienen los ligandos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Análisis del mecanismo de unión del hACE2 CON SARS-CoV-2

La enzima convertidora de angiotensina 2 en humanos (hACE2) forma parte del sistema renina- angiotensina- aldosterona (RAAS). Este sistema es una cascada de señales para que pueda funcionar correctamente. La hACE2 cumple un papel importante en este sistema ya que se encarga de la transformación de angiotensina II (Ang-II) en angiotensina (1-7). La Ang-II es un vasoconstrictor mientras que la Ang (1-7) es vasodilatador, un antagonista de la Ang-II (**Santeliz et al., 2008**).

La ACE2 cumple un papel de gran importancia ya que es regulador central del RAAS. Su importancia radica en que debido a su mecanismo para formar Ang (1-7) logra regular el la presión arterial y ayuda al mantenimiento de líquidos y sal (**Chamsi-Pasha et al., 2014**). En algunas pruebas experimentales se ha comprobado que la ACE2 desempeña una función que beneficia al sistema cardiovascular (**Keidar et al., 2007**).

La hACE2 es el receptor al cual se une el SARS-CoV-2 para poder ingresar a las células. Al ser el regulador central del RAAS y tener gran influencia en la regulación de la presión y del sistema cardiovascular, y ser el punto de entrada del SARS-CoV-2 es de interés conocer el mecanismo de unión del receptor con el virus.

El SARS-CoV-2 se une al hACE2 debido a su alta afinidad y a las estructuras que presentan. La unión se realiza mediante la proteína spike con las subunidades S1 y S2, también presenta un dominio de unión al receptor (RBD) que pertenece a la subunidad S1. La subunidad S1 es la mediadora del reconocimiento y unión al receptor hACE2, y la subunidad S2 lleva a cabo la fusión de la membrana viral con la membrana celular (**Pastrian-Soto, 2020**).

La eficiencia del ingreso del virus en la célula hospedera está determinada por el grado afinidad que se tiene en la unión entre el receptor hACE2 y el dominio RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. La propagación del virus en los humanos se debe a que el dominio RBD de la proteína S se une con una alta afinidad al receptor hACE2, como

consecuencia de esto se conoce que la infección viral tiene efectos negativos en la salud de las personas contagiadas (**Pastrian-Soto, 2020; Wang et al., 2020**).

La unión del receptor hACE2 con el virus SARS-CoV-2 está mediada por interacciones intermoleculares, como puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. Las interacciones se mencionan en la **Tabla 1** y se encuentran en diferentes aminoácidos de las dos estructuras (**Li et al., 2005**).

3.1.2. Resultados del Docking Molecular

Para el estudio de docking molecular, se utilizaron tres librerías de compuestos. En la librería CASPeR se utilizaron los compuestos pertenecientes a Durg. En la librería Chembridge se utilizaron los compuestos de Fragment Library. Finalmente se utilizaron los compuestos pertenecientes a Pathogen Box. Para la elaboración de las librerías de ligandos, se trabajó con 3517 compuestos en Drug, 10064 compuestos en Fragment Library y 400 compuestos en Pathogen Box.

Las tres librerías tienen una diferencia en los compuestos que las componen. La librería Fragment Library está compuesta por fragmentos, es decir, cada estructura es una parte de diversos compuestos, que proviene de un conglomerado. Son moléculas que todavía no tienen un uso, pero mediante el docking molecular se puede saber una posible aplicación, se pueden realizar cambios en los compuestos mediante transformaciones para obtener una molécula potenciada para darle alguna utilidad (**ChemBridge, 2020**). La librería Pathogen Box tiene moléculas que presentan utilidad, es decir, se sabe que funcionan para tratar ciertas enfermedades, pero todavía no son utilizadas como fármacos activos. Los compuestos de esta librería se encuentran en una fase intermedia de desarrollo (**MMV, 2020**).

La librería Drug está compuesta por las estructuras de diferentes compuestos que ya han sido evaluados y aprobados para su uso en pacientes. De este modo los compuestos de Drug, son fármacos activos que se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades (**CASPeR, 2015**).

Se utilizaron estas tres librerías ya que cada una se encuentra en un estado diferente de desarrollo, desde compuestos sin una utilidad, hasta fármacos que son utilizados para el tratamiento de enfermedades. Mediante el docking molecular se puede encontrar

una utilidad a estos compuestos o en el caso de fármacos, se puede encontrar un nuevo uso.

La macromolécula con la cual se realizó el docking fue el receptor hACE2, obtenido del complejo que forma con el SARS-CoV-2 (**Figura 7**), con el archivo PDB 6LZG. La interacción hACE2/ SARS-CoV-2 se realiza con una variedad de aminoácidos, abarcando una amplia zona de interacción, mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (**Tabla 1**) (**Wang et al., 2020**).

Para el presente estudio se tomaron en cuenta cuatro aminoácidos del receptor hACE2 (**Figura 8**), ya que se encuentran en una zona cercana y con potencial de encontrar inhibidores de dicho receptor. Los aminoácidos de hACE2, Lisina- 31 (Lys-31), Glutamato- 35 (Glu-35), Aspartato- 38 (Asp-38) y Lisina- 353 (Lys-353) fueron escogidos como el sitio para realizar el docking.

Según **Wang, et al (2020)**, en su estudio estructural y funcional, los aminoácidos de interés presentan cierto número de fuerzas de Van der Waals en su interacción con SARS-CoV-2, donde Lys-31 presenta 19 interacciones, Glu-35 presenta 8 interacciones, Asp-38 presenta 15 interacciones y Lys-353 tiene 50 interacciones.

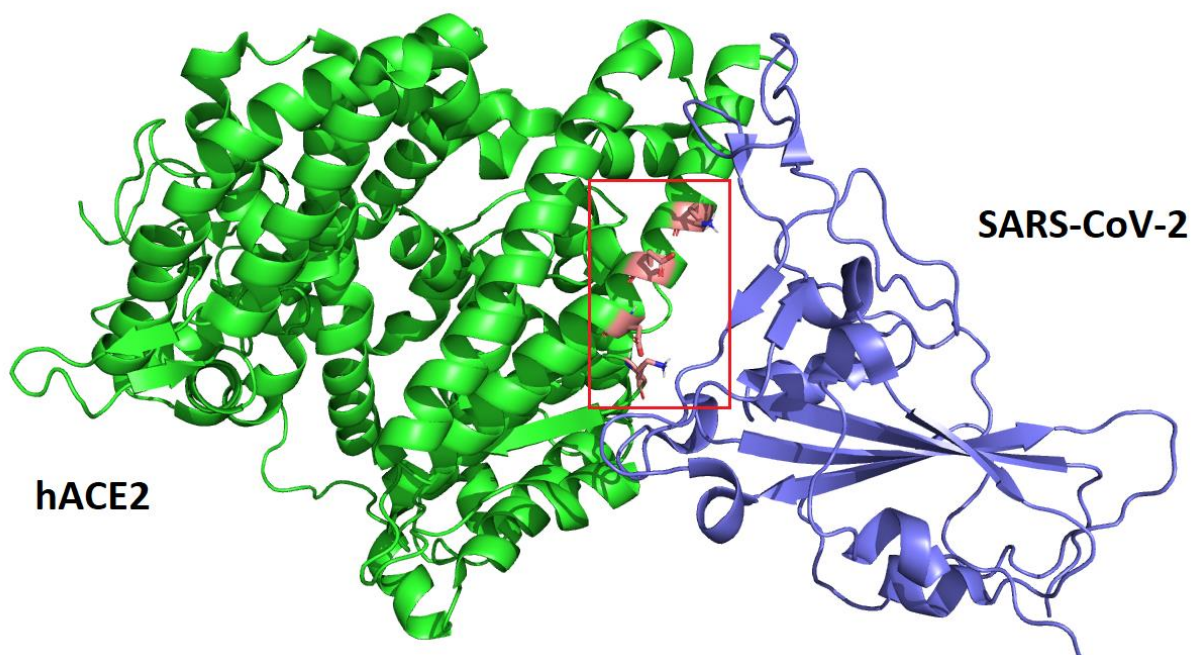


Figura 7. Complejo hACE2/ SARS-CoV-2. En el rectángulo rojo se resalta la zona de los aminoácidos escogidos para realizar el docking

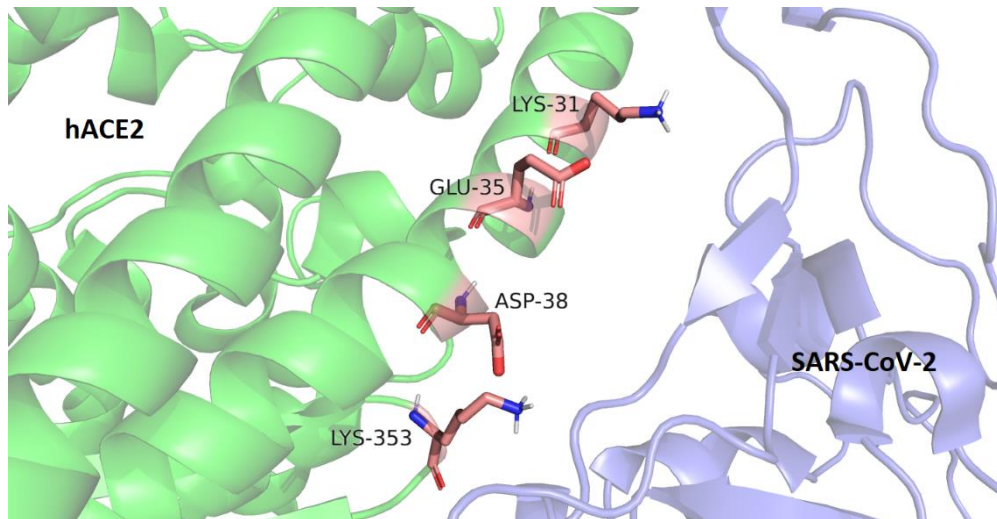


Figura 8. Zona activo para realizar el docking. Los aminoácidos se encuentran representados en color rosado

La Binding Affinity (Afinidad de Unión) es la energía con la que se une el complejo proteína- ligando. La energía de Gibbs (ΔG) permite la unión enzima- ligando solo cuando el cambio de energía es negativo cuando se alcanza un equilibrio de temperatura y presión. La magnitud negativa de la energía de Gibbs determina el grado de asociación del complejo proteína ligando, por lo tanto, de esto depende la afinidad que se tenga. La Binding Affinity es homóloga a la variación de la energía de Gibbs ya que estos valores negativos determinan el grado de unión que tendrá el complejo en estudio (**Du et al., 2016**).

La Binding Affinity se mide con la constante de disociación (K_d), la cual es utilizada para medir y evaluar las fuerzas de interacción intermoleculares entre una proteína y un inhibidor (**Thafar et al., 2019**). A valores bajos de K_d se tendrá una mejor afinidad de unión, es decir, se tendrán valores más bajos de Binding Affinity, y con valores altos de K_d se tendrá una débil interacción entre la proteína y el inhibidor (**Buchwald, 2019; Lee & Olson, 2006**).

Las interacciones intermoleculares que definen a la afinidad de unión son los enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas y de Van der Waals (**Kastritis & Bonvin, 2013**).

Como resultado del docking con las librerías Drug, Fragment Library y Pathogen Box, se obtuvieron diferentes valores de Binding Affinity, para calcular la constante de disociación aparente (K_{dapp}) mediante la fórmula de variación de la energía de Gibbs (ΔG).

En un estudio se calculó la constante de disociación (K_d) del receptor hACE2 al interactuar con SARS-CoV-2 y SARS-CoV. Se encontró una diferencia de aproximadamente 20 veces, la K_d de hACE2 al unirse con SARS-CoV-2 es de 14,7 nM. Mientras que la K_d al interactuar con SARS-CoV es de 325 nM. Esta diferencia comprueba la fuerte afinidad que tiene la interacción hACE2/ SARS-CoV-2 y por lo tanto se han evidenciado las consecuencias en la salud de pacientes con el virus **(Huang & Chai, 2020)**.

Conociendo la constante de disociación real (K_d) de 14,7 nM para hACE2 en su interacción con SARS-CoV-2, se calculó el valor de la energía de Gibbs utilizada en esta interacción, siendo un valor de -11,12 kcal/mol. Partiendo de la energía de Gibbs de la interacción hACE2/ SARS-CoV-2, se pudo establecer un punto de partida para la elección de los ligandos que presenten mejor afinidad. Se escogerían los ligandos con valor de Binding Affinity igual o menor a -11,12 kcal/mol ya que los ligandos que se encuentren en dicho rango podrán competir para la inhibición del receptor hACE2. La interacción hACE2/ SARS-CoV-2 se realiza a lo largo de todo el sitio activo, evidenciando una alta afinidad de unión **(Du et al., 2016)**.

En el estudio de docking molecular realizado, se escogió una sección del sitio activo, utilizando cuatro aminoácidos pertenecientes al receptor hACE2, los cuales fueron, Lisina- 31 (Lys-31), Glutamato- 35 (Glu-35), Aspartato- 38 (Asp-38) y Lisina- 353 (Lys-353).

Los resultados obtenidos **(Tabla 2)** indican una menor afinidad de los ligandos en comparación con la interacción hACE2/ SARS-CoV-2. Se realizó la elección de los ligandos con mejor interacción de todas las librerías analizadas, escogiendo los que se encontraron en un rango de Binding Affinity de -5.6 a -6.9 kcal/mol. La mejor K_{dapp} de los ligandos fue de 13,7 μ M el cual es un valor superior a 14,7 nM. Los resultados obtenidos indican que los ligandos tienen menor afinidad que el complejo hACE2/ SARS-CoV-2 ya que presentan un mayor K_{dapp} que el de referencia, teniendo interacciones más débiles en comparación al complejo hACE2/ SARS-CoV-2. Estos

resultados pueden ser causa de varios factores, entre ellos el hecho de que se seleccionaron cuatro aminoácidos de todos los que interactúan en la formación de este complejo (**Tabla 1**). Las enzimas presentan cavidades denominadas sitios activos, los cuales funcionan mediante los aminoácidos que interactúan con el compuesto o ligando de interés (**Ramírez, 2014**). Si el sitio activo de una enzima es reducido, también reducirá proporcionalmente la afinidad de unión de dicho sitio activo. En el caso del receptor hACE2, al funcionar con algunos aminoácidos en su sitio activo, presenta una alta afinidad (**Li et al., 2005**).

Al realizar el docking molecular en cuatro aminoácidos, se ve reducida la afinidad. Los ligandos seleccionados que tuvieron mejor interacción sirven para estudios posteriores, continuando con el docking en los demás sitios activos hasta completar el análisis y así poder encontrar una molécula combinada que abarque todo el sitio activo para que pueda realizar una inhibición del receptor hACE2 con mayor afinidad. La inhibición combinada se realiza con más de una molécula activa o ligando, en este caso se pueden continuar estudios para encontrar ligandos que se unan a lo que resta del sitio activo y así realizar una inhibición combinada del receptor hACE2 (**Blasco et al., 2019**).

Tabla 2. Resultados de los ligandos con mejores interacciones con el receptor hACE2

#	Ligando	Library	Binding Affinity (kcal/mol)	K _d (μM)	Interacciones (Å)													
					Hydrogen Bonds			Donor-Donor	Hydrophobics						Electrostatics			Halogen: Fluorine
					Conventional	Carbon	Pi Donor		Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Pi T-Shaped	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Amide- Pi Stacked	Pi-Cation	Pi-Anion	Charge-Charge	
1	4SC-202	Drug	-6,1	50,31	Glu37 (2,84)	-	-	-	Lys31 (4,58)	Lys31 (4,40); Lys35 3 (5,45)	-	His34 (4,60)	-	Asp30 (3,89)	-	-	-	-
2	AZD1480	Drug	-6,2	42,78	Glu35 (2,30)	-	-	-	Lys31 (4,52)	-	-	His34 (4,47)	-	-	His34 (4,39); Arg39 3 (4,75)	Glu37 (3,08)	-	-
3	AZ 628	Drug	-6	59,18	Lys35 3 (2,02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Glu37 (3,9); Aps38 (3,336), (3,94)	-	-
4	Amuvatini b (MP-470)	Drug	-6	59,18	Lys31 (2,42)	His34 (3,30); Glu35 (3,65)	Lys31 (3,29)	-	-	Lys31 (4,12), (4,64)	His34 (5,53)	-	-	-	Lys31 (3,29)	Glu37 (3,89); Glu35 (4,71)	-	-
5	NVP-BHG712	Drug	-6,5	26,29	-	Lys35 3 (3,62)	-	-	Leu25 (5,28)	Tyr41 (5,42)	Tyr41 (5,22)	-	Lys35 3 (3,87)	-	Lys35 3 (3,22)	Glu37 (4,05); Asp38 (3,54), (3,91), (4,27)	-	-

6	LOSARTAN	Drug	-5,9	69,6	Asn33 (2,99); Glu37 (2,56); Asp38 (2,82)	-	-	-	Lys31 (4,79)	Lys35 ₃ (4,98)	-	His34 (3,85)	-	-	His34 (3,71)	Glu37 (4,01)	-	-
7	1-(2-naphthoyl)-4-piperidine carboxamide	Fragment Library	-5,6	113,24	Lys35 ₃ (2,64)	-	-	-	-	-	-	His34 (4,51)	-	-	His34 (4,32)	Glu37 (3,43), (3,96)	-	-
8	2-oxo-N-(2-pyridinyl methyl)-1,2-dihydro-4-quinolinecarboxamide	Fragment Library	-5,6	113,24	Lys35 ₃ (3,08)	-	-	-	-	Lys35 ₃ (5,03)	-	-	-	-	-	Lys35 ₃ (3,34), (4,60)	-	-
9	3-methyl-N-(3-pyridinyl methyl)-1-benzofuran-2-carboxamide	Fragment Library	-5,6	113,24	-	His34 (3,37)	-	-	-	-	-	His34 (4,65), (5,09)	-	-	His34 (4,5)	Glu37 (3,24- 3,83)	-	-

10	7-(4-fluorophenyl)-5-(3-pyridinyl)-4,5,6,7-tetrahydro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine	Fragment Library	-5,8	81,86	Lys35 3 (2,88)	-	-	-	Lys35 3 (4,86)	-	-	-	-	-	-	Glu37 (4,11)	-	-
11	N-(2-amino-2-oxoethyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-6-carboxamide (non-preferred name)	Fragment Library	-5,8	81,86	His34 (2,92); Glu35 (2,39); Lys35 3 (2,41)	-	-	-	His34 (4,68)	-	-	-	-	-	-	Glu37 (3,19), (3,97)	-	-
12	MMV688372 (KINETOPLASTIDS)	Pathogen Box	-6,9	13,74	Lys35 3 (2,57), (2,72); Glu37 (1,99)	His34 (3,72) Glu37 (3,37)	His34 (3,54)	Lys35 3 (2,33)	-	-	-	-	-	-	His34 (4,48)	Glu35 (3,37)	Glu37 (4,06)	Lys35 3 (2,57), (2,72)
13	MMV687246 (MALARIA)	Pathogen Box	-6,7	19,01	Lys35 3 (1,98)	Lys35 3 (3,42)	-	-	Pro38 9 (5,35)	-	-	-	-	-	-	Glu37 (3,95), (4,17)	-	-

14	MMV016 838 (MALARIA)	Pathogen Box	-6,7	19,01	Glu37 (2,52)	-	-	-	-	Lys35 3 (4,84)	His34 (5,17)	-	-	-	-	Glu37 (4,06), (4,27)	-	-
15	MMV688 178 (SCHISTOSOMIASIS)	Pathogen Box	-6,9	13,74		-	-	-	-	Lys35 3 (5,13); Lys31 (4,16)	His34 (5,11)	-	-	-	-	Glu37 (3,77)	-	-

**En las interacciones se presentan los aminoácidos de hACE2 con los que interactúa el ligando y la medida de dicha interacción se encuentra entre paréntesis.*

En la Tabla 2 se presentan los resultados de los mejores ligandos obtenidos del docking molecular del receptor hACE2 contra las librerías Drug, Fragment Library y Pathogen Box. Entre los resultados se encuentra Binding Affinity (Afinidad de unión), la constante de disociación aparente (K_{dapp}) y las interacciones encontradas en el complejo que se formó con cada ligando. Las principales interacciones formadas son puentes de hidrógeno, puentes de hidrógeno carbono, fuerzas electrostáticas, enlaces halogenados, enlaces pi. Los ligandos presentados son los que presentaron una mejor interacción con el sustrato (hACE2). Los ligandos generan varias conformaciones y de estas conformaciones se escoge la que sea mejor energéticamente, es decir que presente menor liberación de energía en la formación del complejo enzima- ligando (Lee & Olson, 2006).

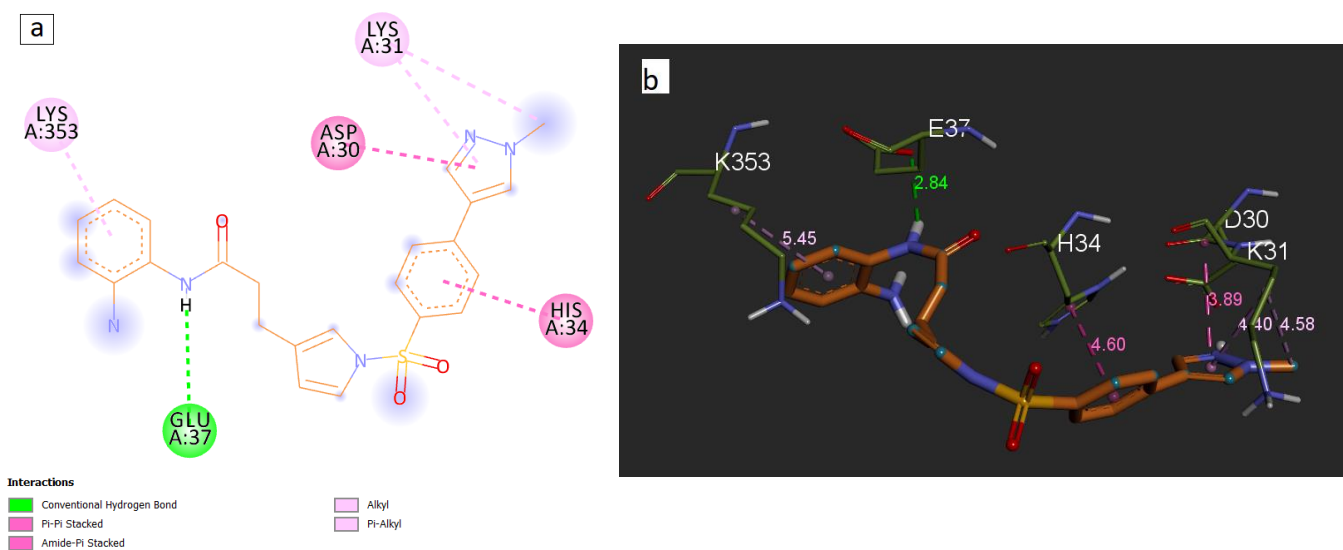


Figura 9. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 4SC-202 de la librería Drug. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

El ligando 4SC-202 perteneciente a la librería de compuestos Drug (**Figura 9**) presentó una energía de unión de -6,1 kcal/mol y una K_{dapp} de 50,31 μ M. Las interacciones presentes en este complejo enzima- ligando fueron, un puente de hidrógeno convencional de 2,84 Å con Glu-37, una interacción alkyl de 4,58 Å con Lys-31, enlaces Pi- Alkyl de 4,40 Å con Lys-31 y 5,45 con Lys-353, un enlace Pi-Pi stacked

de 4,60 Å con His34 y un enlace Amida-Pi stacked de 3,89 Å con Asp-30 (Brylinski, 2018).

El ligando 4SC-202 presentó tres interacciones con los aminoácidos en los que se realizó el docking, son embargo existen más interacciones de las mencionadas ya que al realizar el Grid en el proceso del docking, se selecciona un área de interés y en esta área se encontraban más aminoácidos que pueden hacer interacción. Estos aminoácidos son Glu-37, His-34 y Asp-30. La interacción de los ligandos adicionales le brinda una mayor afinidad al ligando, ya que participan en la unión al sitio elegido para realizar la inhibición (Du et al., 2016).

Existe un puente de hidrógeno con una distancia de 2,84 Å, lo cual es indicativo de que es una interacción moderada (Dannenberg, 1998). Otro tipo de enlace que se formó con Lys-31 es la interacción alkyl, el cual resulta de la unión de un carbono con una cadena de carbonos, la cual ha perdido un hidrógeno para poder formar esta interacción. La Ly-31 y Lys-353 también forman interacciones de tipo Pi- alkyl, estas se realizan con un grupo aromático mediante la nube de pi- electrones y un grupo alquilo (Arthur & Uzairu, 2019).

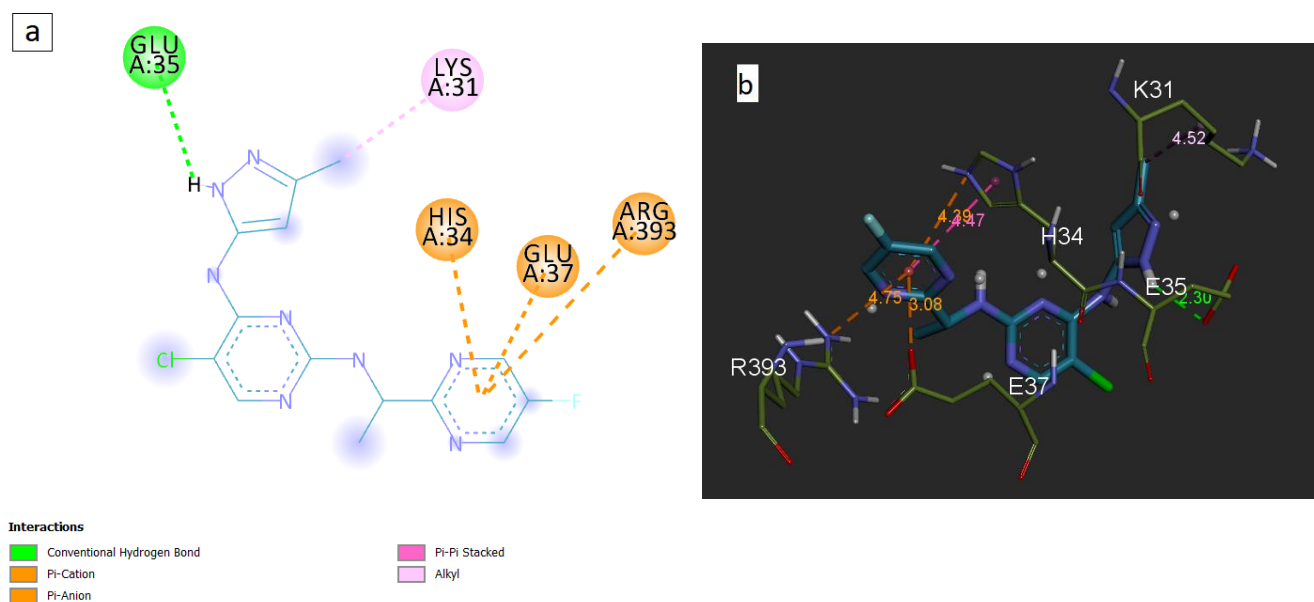


Figura 10. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando AZD1480 de la librería Drug. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

Las interacciones del ligando AZD1480 (**Figura 10**) de Drug dio como afinidad de unión $-6,2$ kcal/mol y una K_{dapp} de $42,78$ μ M. En la Figura 10 se identifican las interacciones realizadas por este ligando. Existen un enlace de hidrógeno convencional de $2,3$ Å con Glu-35, un enlace alkyl de $4,52$ Å con Lys-31, un enlace Pi-Pi stacked de $4,47$ con His-34, dos fuerzas electrostáticas Pi- catión de $4,39$ Å con His34 y de $4,75$ Å con Arg-393 y una Pi- anión de $3,08$ Å con Glu-37.

Las fuerzas intermoleculares son las encargadas de las interacciones y su estabilidad de unión, esto debido a las fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Las fuerzas electrostáticas se realizaron entre un anillo aromático con el nitrógeno (pi- catión) y oxígeno (pi- anión). Mientras que en las interacciones hidrofóbicas Pi-Pi stacked se encuentran interactuando dos anillos, uno del ligando y otro de His-34.

Las interacciones formadas con los aminoácidos de interés para el docking se llevaron a cabo en la Lys-31, formando una interacción alkyl, con carbono terminal de la cadena del ligando.

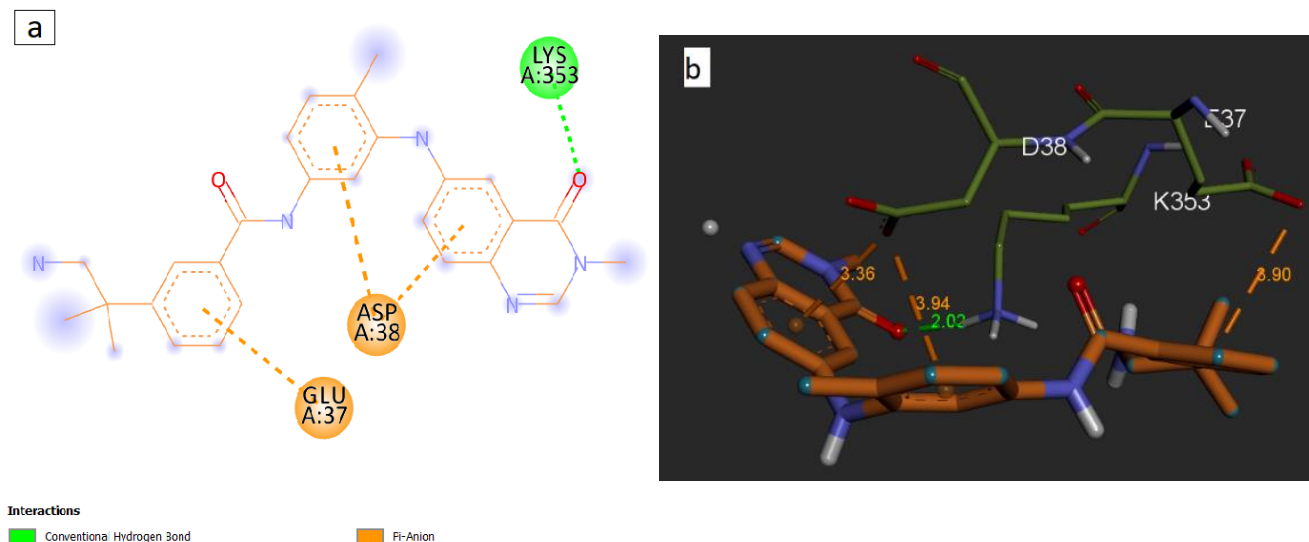


Figura 11. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando AZ 628 de la librería Drug. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

La afinidad de unión del ligando AZ 628 fue de $-6,0$ kcal/mol y la K_{dapp} obtenida en esta interacción fue de $59,18$ μ M. las interacciones entre el hACE2 y el ligando fueron un enlace de hidrógeno convencional de $2,02$ Å con Lys-353, mediante la unión de un

oxígeno de la cadena del ligando, con una afinidad alta (Dannenberg, 1998). También se presentaron fuerzas electrostáticas de tipo Pi- anión de 3,9 Å con Glu-37 y de 3,94 Å con Asp-38, los cuales le dan un equilibrio al complejo enzima- ligando, ya que se forma entre el oxígeno una nube de electrones pi de un grupo aromático deficiente (Schottel et al., 2008). En estas fuerzas interactúa el oxígeno de los aminoácidos con grupos aromáticos del ligando. Las interacciones electrostáticas más el fuente de hidrógeno presente le brinda la afinidad de interacción del ligando con la macromolécula.

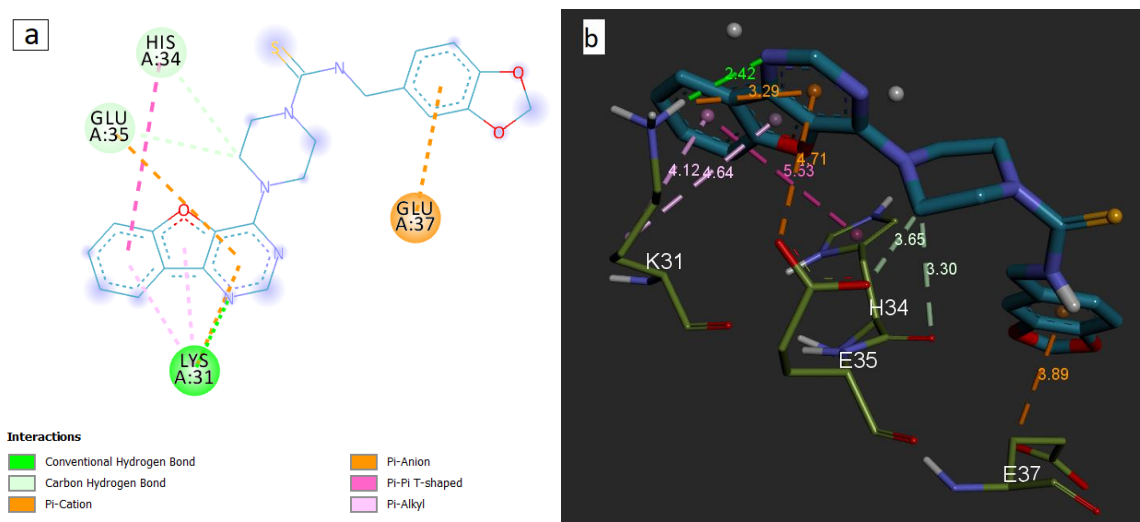


Figura 12. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando Amuvatinib (MP-470) de la librería Drug. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

Con una afinidad de unión de -6,0 kcal/mol, el ligando Amuvatinib (MP470), realizó interacciones (Figura 12) en el complejo con una K_{dapp} de 59.18 μ M. Entre las interacciones realizadas se encuentran un puente de hidrógeno convencional de 2,42 Å con Lys-31, con una fuerte unión debido a la corta distancia entre este enlace (Steiner & Koellner, 2001). Con el mismo aminoácido Lys- 31 existe una interacción Pi- donor, realizada entre un H del aminoácido en mención y un anillo aromático del ligando Amuvatinib (MP470).

Los enlaces de hidrógeno-carbono de 3,30 Å con His-34 y de 3,65 Å con Glu-35. Un enlace Pi- alkyl de 4,12 Å y de 4,64 Å con Lys-31, los cuales se deben a la unión de

las nubes pi con un grupo alquilo de la cadena del ligando. También un enlace Pi-Pi T- shaped de 5,53 Å entre His-34 y un anillo aromático del ligando. Este tipo de interacción tiene la forma de T ya que interactúa el borde de un anillo con la cara de otro, obteniendo esta forma geométrica de interacción de los anillos (Garau, 2006). Las fuerzas electrostáticas se encuentran con enlaces Pi- catión de 3,29 Å entre Lys-31 y un hidrógeno del ligando. y los enlaces Pi-anión de 3,89 Å con Glu-37 y de 4,71 Å con Glu35 interaccionan con un oxígeno presente en estos aminoácidos.

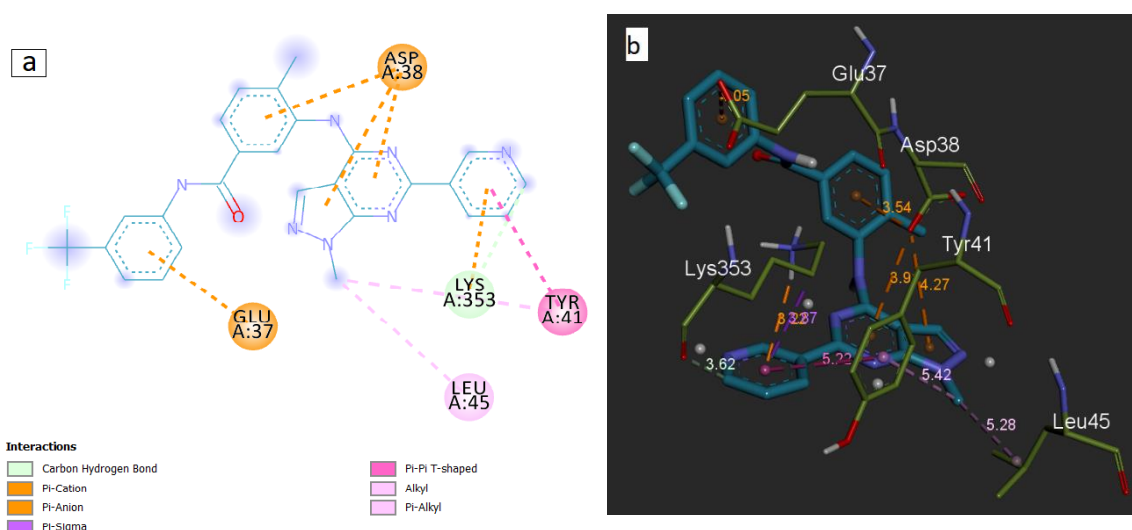


Figura 13. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando NVP-BHG712 de la librería Drug. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

El ligando NVP-BHG712 de Drug, presentó una energía de unión de -6,5 kcal/mol y un Kdapp de 26,96 μ M. En la **Figura 13** se observan las interacciones de forma gráfica y se tiene un enlace de carbono- hidrógeno de 3,62 Å con Lys-353. Presenta cuatro interacciones hidrofóbicas, entre los cuales se encuentran un enlace akyl de 5,28 Å con Leu-25, un enlace Pi- alkyl de 5,42 Å con Tyr-41 y con el mismo aminoácido un enlace Pi-Pi T- shaped de 5,22 Å. También se tiene un enlace Pi- sigma de 3,87 Å con Lys-353. La fuerzas electrostáticas se encuentran definidas por una Pi- catión de 3,22 Å con Lys-353 y con Pi- anión de 4,05 Å con Glu-37, de 3,54 Å, 3,91 Å y 4,27 con Asp-38.

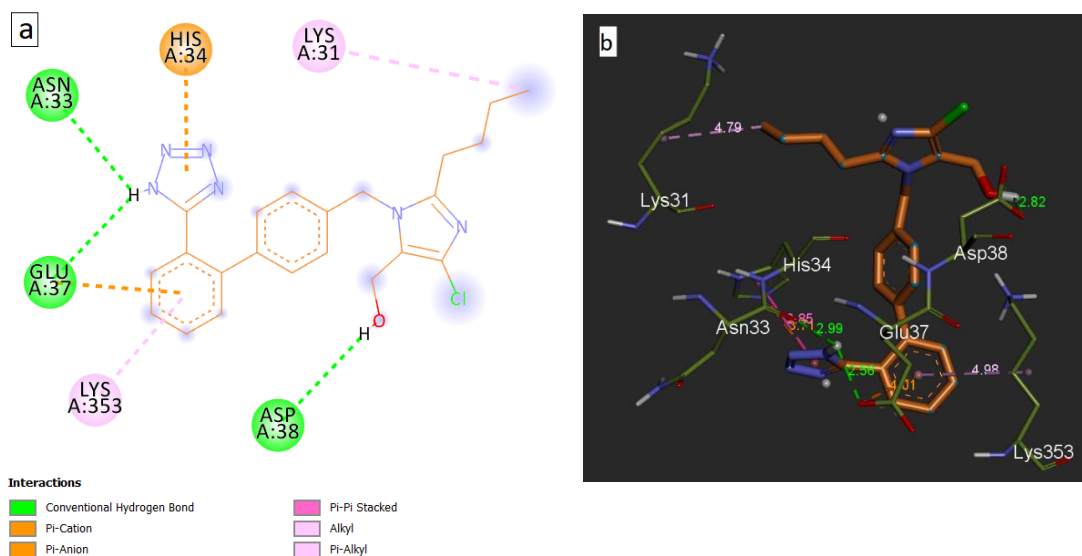


Figura 14. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando LOSARTAN de la librería Drug. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

Las interacciones de LOSARTAN se muestran en la **Figura 14**, debido a una afinidad de unión de $-5,9$ kcal/mol y una K_{dapp} de $69,6$ μ M. Las interacciones formadas son puentes de hidrógenos convencionales con distancias que varían entre $2,56$ Å y $2,99$ Å, en los aminoácidos Asn-33, Glu-37 y Asp-38, siendo el último de importancia para el sitio activo del receptor hACE2. También se presentan interacciones alkyl con Lys-31; Pi-alkyl con Lys-353. Las interacciones Pi-Pi stacked se dan entre un anillo de His-34 y un anillo del ligando, esta forma de apilamiento paralelo desplazado es una de las más estables para la estabilidad de las interacciones intermoleculares (**Arthur & Uzairu, 2019; Garau, 2006**). Las fuerzas electrostáticas se encuentran representadas por las interacciones Pi- catión con His-34 y Pi- anión con Glu-37.

Losartán es un fármaco utilizado para el control de la hipertensión, el cual es un fármaco que es antagonista del receptor AT1R. Este medicamento es administrado por vía oral. Una vez dentro del organismo, produce el ácido 5 carboxílico, el cual es un metabolito activo que ayuda a prolongar el control de la hipertensión durante 24 horas. El medicamento tiene una eliminación por las vías hepática y renal y se debe tener cuidado en pacientes con problemas en estos sistemas (**Contreras et al., 2000**).

Es interesante haber obtenido este medicamento como un posible ligando para bloquear el sitio activo del hACE2. Ya que losartán es un bloqueador de la angiotensina II al impedir la acción del receptor AT1R, dentro del sistema renina-

angiotensina- aldosterona. Al encontrarse dentro de este sistema, se encuentra directamente relacionado con el virus del SARS-CoV-2 ya que se une mediante el receptor hACE2, también parte del sistema renina- angiotensina- aldosterona. Es importante el desarrollo de estudios y pruebas para saber la influencia de losartán en los efectos de la enfermedad de COVID-19 (Chamsi-Pasha et al., 2014).

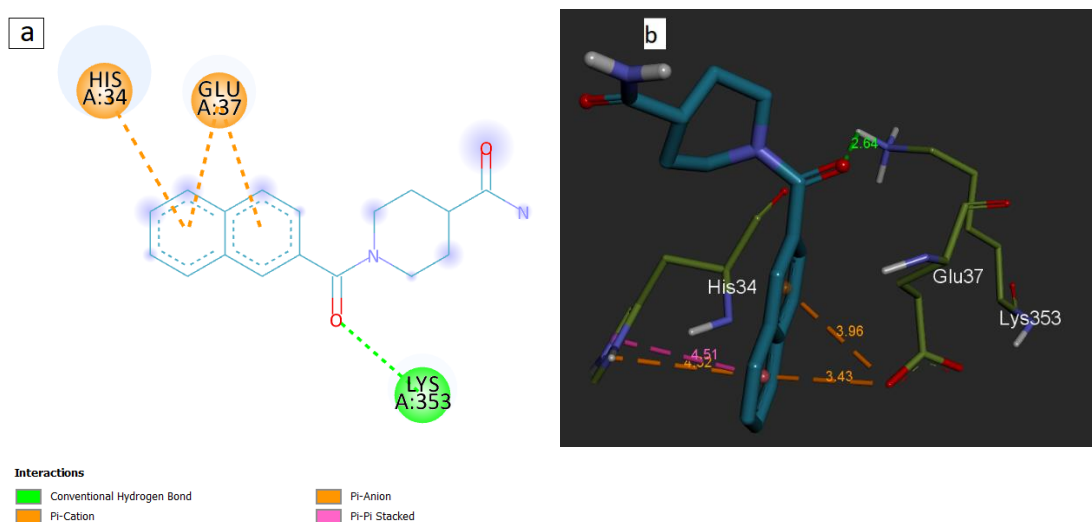


Figura 15. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 1-(2-naphthoyl)-4-piperidinecarboxamide de la librería Fragment Library. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

El ligando 1-(2-naphthoyl)-4-piperidinecarboxamide se muestra con sus interacciones en la **Figura 15**. Presenta una afinidad de unión de $-5,6$ kcal/mol y una K_{dapp} de $113,24$ μ M. Las interacciones con los aminoácidos seleccionados para el presente estudio son Lys-353, realizando enlaces de hidrógeno convencionales con una distancia de $2,64$ Å. También se registran otro tipo de interacciones hidrofóbicas entre las cuales se encuentran Pi-Pi stacked de $4,51$ Å con un anillo de His-34 y un anillo aromático del ligando de interés. Las fuerzas electrostáticas son de tipo Pi- catión de $4,32$ Å con His-34 y Pi-anión de $3,43$ Å y $3,96$ Å con Glu-37, en estas interacciones actúa el mismo átomo de oxígeno de Glu-37 con dos anillos aromáticos de la cadena del ligando.

Este ligando es uno de los que presentan afinidad más baja y puede ser razón de las pocas interacciones que presenta, con un total de 5. A comparación con otros ligandos estudiados, que presentan un número mayor de interacciones.

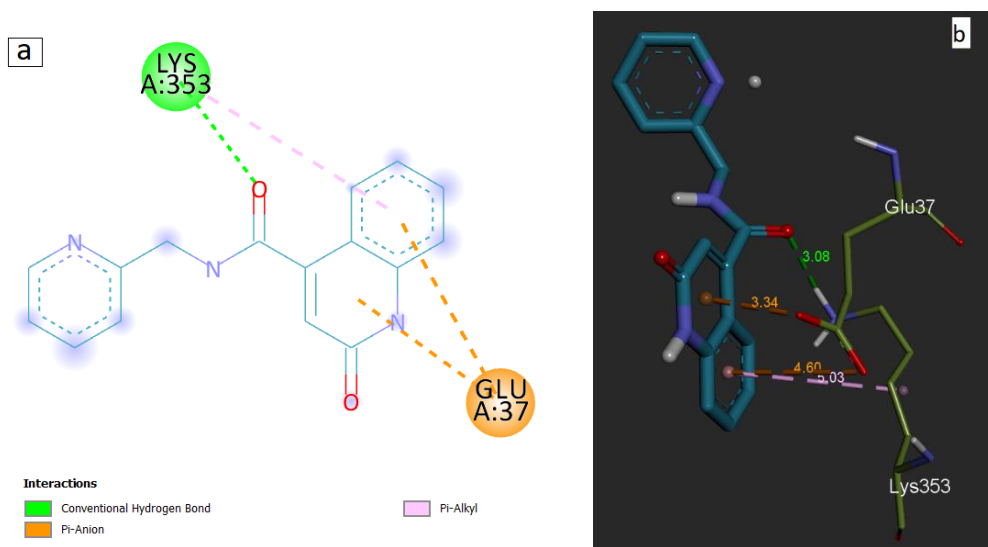


Figura 16. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 2-oxo-N-(2-pyridinylmethyl)-1,2-dihydro-4-quinolinecarboxamide de la librería Fragment Library. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

El ligando 2-oxo-N-(2-pyridinylmethyl)-1,2-dihydro-4-quinolinecarboxamide de Frgament Library, dio como resultado una afinidad de unión de -5.6 kcal/mol y una K_{dapp} de $113,24$ μ M. Las interacciones con este ligando se dieron únicamente con Lys-353, con un puente de hidrógeno de $3,08$; una interacción Pi-alkyl de $5,03$ Å y dos interacciones Pi- anión de $3,34$ Å y $4,60$ Å (**Figura 16**). Las dos interacciones Pi- anión se realizaron entre dos anillos aromáticos del ligando y dos átomos de oxígeno.

El ligando en estudio también presenta una afinidad de las más bajas del total de los estudiados. Con un total de cuatro interacciones de todos los tipos presenta fuerzas débiles en comparación con los ligandos de mayor afinidad.

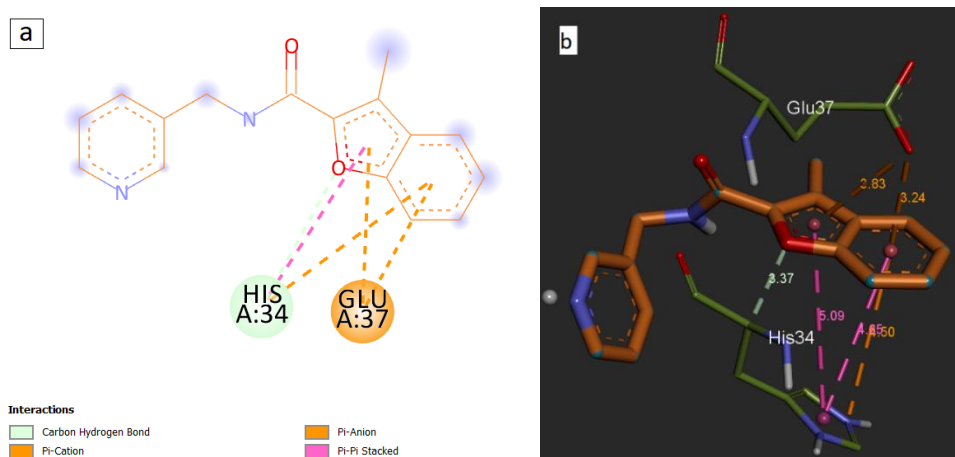


Figura 17. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 3-methyl-N-(3-pyridinylmethyl)-1-benzofuran-2-carboxamide de la librería Fragment Library. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

En la **Figura 17** se puede observar las interacciones presentes en el ligando 3-methyl-N-(3-pyridinylmethyl)-1-benzofuran-2-carboxamide. Todas las interacciones son afectadas por la afinidad de unión que presenta la estructura, siendo esta de -5.6 kcal/mol y una K_{dapp} de $113,24 \mu\text{M}$.

La His-34 presenta puentes de carbono- hidrógeno de $3,37 \text{ \AA}$. También presenta interacciones Pi-Pi stacked, las cuales tienen una distancia de $4,65 \text{ \AA}$ y $5,09 \text{ \AA}$, estas interacciones hidrofóbicas de encierran interactuando entre dos diferentes anillos del ligando 3-methyl-N-(3-pyridinylmethyl)-1-benzofuran-2-carboxamide y el mismo anillo del aminoácido His-34.

Presenta tres fuerzas electrostática, de las cuales, solo existe una de tipo Pi- catión de $4,5 \text{ \AA}$ entre un átomo de nitrógeno de His-34 y un anillo del ligando. Existen dos fuerzas de tipo Pi- anión don una distancia de $3,24 \text{ \AA}$ y $3,83 \text{ \AA}$, entre dos anillos del ligando y el mismo átomo de oxígeno de Glu-37.

Este ligando también presenta una afinidad baja, una de las posibles causas es que presenta pocas interacciones intermoleculares. También estas interacciones se encuentran en un solo sector del ligando, es decir solo interactúa con los aminoácidos His-34 y Glu-37, lo cual no le permite estabilizar de la mejor forma al ligando.

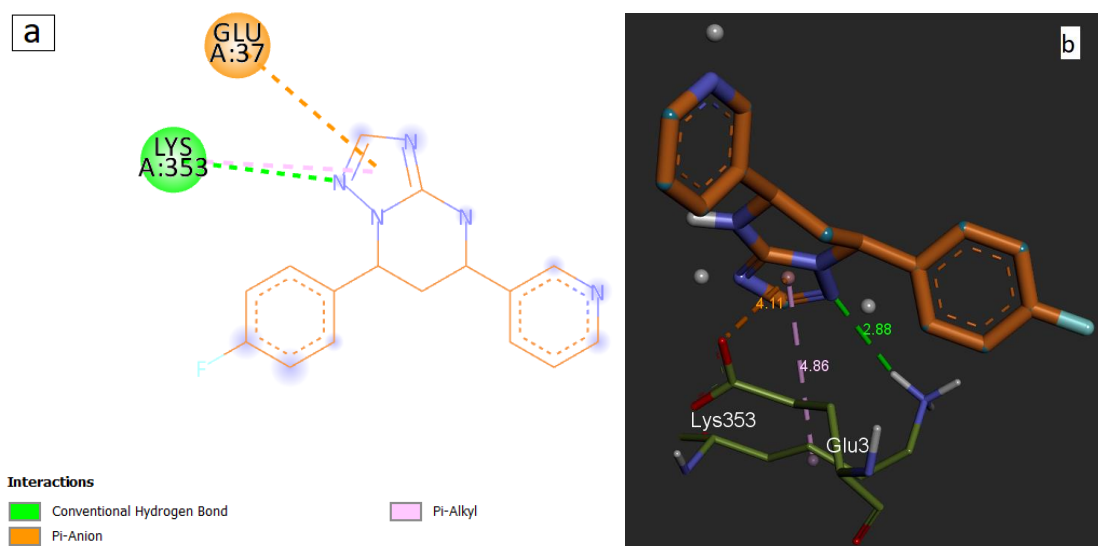


Figura 18. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando 7-(4-fluorophenyl)-5-(3-pyridinyl)-4,5,6,7-tetrahydro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine de la librería Fragment Library. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

El ligando 7-(4-fluorophenyl)-5-(3-pyridinyl)-4,5,6,7-tetrahydro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine, reveló una afinidad de unión de -5.8 kcal/mol y una K_{dapp} de $81,86$ μ M. La afinidad encontrada no es la más baja de todas las interacciones de los ligandos analizados, pero sí se encuentra entre las que menos fuerza presentan.

Este ligando presentó únicamente tres interacciones. Dos interacciones se llevan a cabo con Lys-353, con un puente de hidrógeno convencional de $2,88$ Å y una interacción Pi-alkyl de $4,86$ Å. También presenta una fuerza electrostática de tipo Pi- anión con una distancia de $4,11$ Å y se lleva a cabo mediante la interacción de un átomo de oxígeno de Glu-37 con un anillo del ligando.

Todas las interacciones mencionadas ocurren alrededor de un anillo del ligando, por lo tanto, no presenta una completa estabilidad. El ligando 7-(4-fluorophenyl)-5-(3-pyridinyl)-4,5,6,7-tetrahydro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine presenta un total de tres anillos y puede ser modificado para brindarle mayor afinidad y obtener más interacciones.

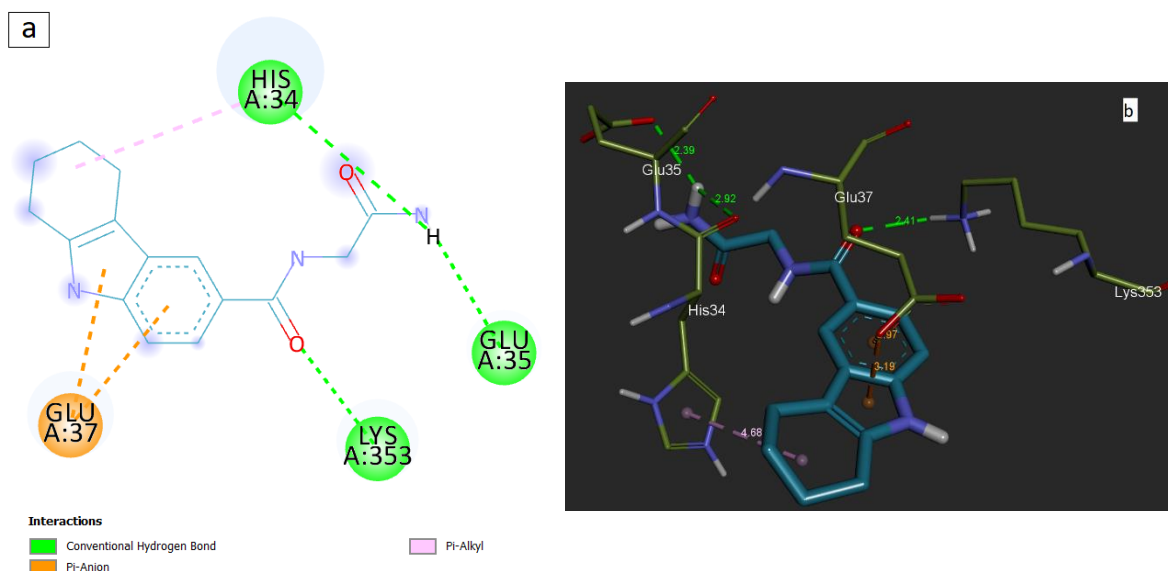


Figura 19. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando N-(2-amino-2-oxoethyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-6-carboxamide (non-preferred name) de la librería Fragment Library. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

Las interacciones del ligando N-(2-amino-2-oxoethyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-6-carboxamide (non-preferred name) se muestran en la **Figura 19**. Se tuvo como resultado una afinidad de unión de -5.8 kcal/mol y una K_{dapp} de 81,86 μ M.

Las interacciones obtenidas en este complejo son en su mayoría puentes de hidrógeno convencionales, con una distancia de 2,92 Å con Hi-34, 2,39 Å con Glu-35 y de 2,41 Å con Lys-353. También existe una interacción hidrofóbica de tipo Pi- alkyl con el aminoácido His-34 y una distancia de 4,68 Å. Existen dos fuerzas hidrostáticas de tipo pi- anión con Glu-37 con distancias de 3,19 Å y 3,97 Å.

Las interacciones con los aminoácidos de interés son dos puentes de hidrógeno de 2,39 Å con Glu-35 y de 2,41 Å con Lys-353.

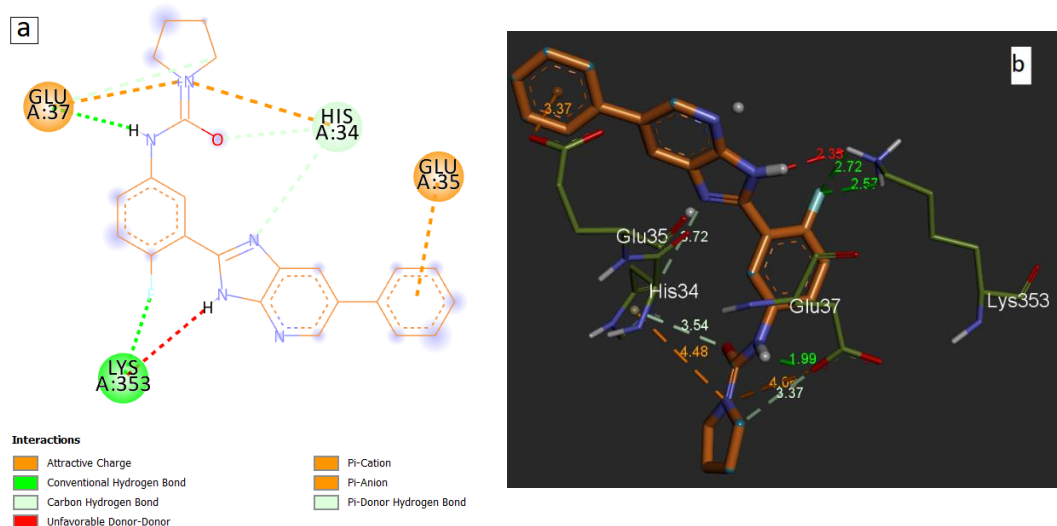


Figura 20. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando MMV688372 (KINETOPLASTIDS) de la librería Pathogen Box. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

Pathogen Box brinda una serie de ligandos, entre ellos MMV688372 (KINETOPLASTIDS). Este ligando dio como resultado una afinidad de unión de $-6,9$ kcal/mol y una K_{dapp} de $13,14 \mu\text{M}$.

Presenta una serie de interacciones con algunos aminoácidos. Existen tres tipos de enlaces de hidrógeno, los convencionales se realizan con Lys-353 con una distancia de $2,57 \text{ \AA}$ y $2,72 \text{ \AA}$; y con Glu-37 con una distancia de $1,99 \text{ \AA}$. Los enlaces de carbono-hidrógeno tienen una distancia de $3,72 \text{ \AA}$ con His-34 y de $3,37 \text{ \AA}$ con Glu-37. El último es de tipo Pi- donador, el cual mide $3,54 \text{ \AA}$ y se realiza con His-34. En este último tipo de enlace interactúa un átomo de oxígeno del ligando con un anillo de His-34.

También existe una interacción donador- donador, la cual mide $2,33 \text{ \AA}$ y consiste en la interacción de dos átomos de hidrógeno, uno perteneciente al ligando y otro perteneciente a Lys-353. Existen fuerzas electrostáticas de tipo Pi- catión de $4,48 \text{ \AA}$ con His-34 y Pi- anión de $3,37$ con Glu-35. También existe otro tipo de fuerza electrostática, denominada charge- charge, con una distancia de $4,06 \text{ \AA}$ la cual consiste en la interacción de un anión con un catión, en este caso un átomo de oxígeno con un átomo de nitrógeno.

La última interacción es de tipo halógeno con flúor, con distancias de $2,57 \text{ \AA}$ y $2,72 \text{ \AA}$ con Lys-353. Esta interacción es muy fuerte debido a la electronegatividad del flúor (Steiner & Koellner, 2001).

Entre las interacciones de interés se encuentra con Lys-353, ya que realiza puentes de hidrógeno convencionales, enlace donor-donor, interacción Pi-anión y una interacción con un halógeno (flúor) (**Figura 20**).

Este ligando MMV688372 (KINETOPLASTIDS) presenta la mejor afinidad de unión y también presenta mayor cantidad de interacciones a lo largo de toda su estructura y con cuatro aminoácidos de la macromolécula. Entre sus interacciones presenta dos interacciones con el flúor, lo cual le brinda una mayor fuerza de unión enzima- ligando (**Arthur & Uzairu, 2019**).

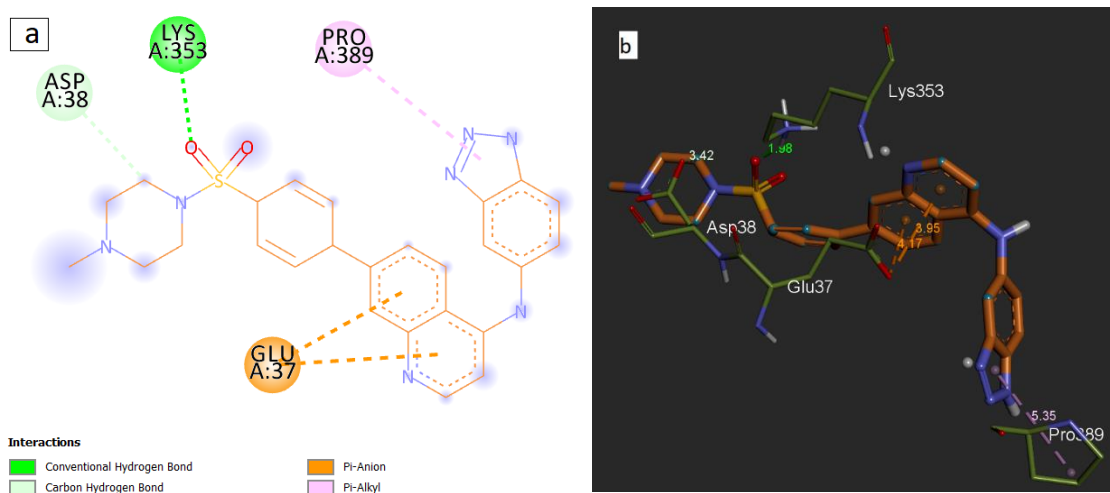


Figura 21. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando MMV687246 (MALARIA) de la librería Pathogen Box. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

El ligando MMV687246 (MALARIA) dio como resultado una afinidad de unión de -6,7 kcal/mol y una K_{dapp} de 19,01 μ M. Presenta algunas interacciones (**Figura 21**), dentro de las cuales se encuentran principalmente las realizadas con Lys-353, con un puente de hidrógeno convencional de 1,98 Å y un puente de carbono- hidrógeno de 3,42 Å. También presenta una interacción hidrofóbica de tipo Pi-alkyl de 5,35 Å con Pro-389.

Presenta dos fuerzas electrostáticas de tipo Pi-anión de 3,95 Å y de 4,17 Å con Glu-37.

Presenta una de las afinidades más altas de todos los ligandos. Las interacciones encontradas, se realizan en tres zonas del ligando con diferentes aminoácidos de la macromolécula, esto le permite tener una estabilidad en su unión.

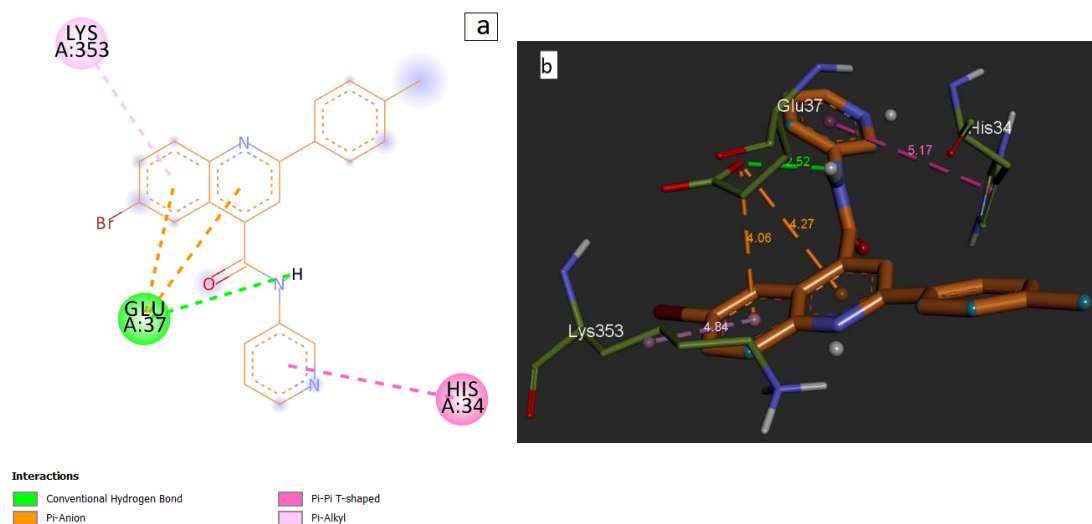


Figura 22. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando MMV016838 (MALARIA) de la librería Pathogen Box. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

La afinidad de unión del ligando MMV016838 (MALARIA) fue de $-6,7$ kcal/mol y una K_{dapp} de $19,01$ μ M.

Las interacciones realizadas (**Figura 22**) son un puente de hidrógeno convencional de $2,52$ Å con Glu-37. También presenta interacciones hidrofóbicas de tipo Pi-alkyl de $4,84$ Å con Lys-353 y una interacción Pi-Pi T- shaped de $5,17$ Å entre un anillo del ligando y el aminoácido His-34.

Existen dos fuerzas electrostáticas de tipo Pi- anión de $4,06$ Å y de $4,27$ Å con Glu-37.

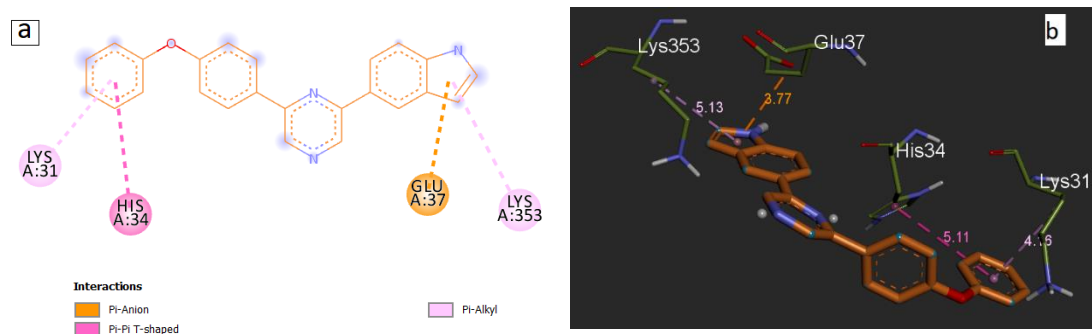


Figura 23. Interacciones intermoleculares del receptor hACE2 con el ligando MMV688178 (SCHISTOSOMIASIS) de la librería Pathogen Box. a) Estructura en 2d del ligando. b) Estructura en 3d del ligando

La afinidad de unión del ligando MMV688178 (SCHISTOSOMIASIS) fue de -6,9 kcal/mol y una K_{dapp} de 13,74 μ M.

Las interacciones encontradas (**Figura 23**) son interacciones hidrofóbicas de tipo Pi-alkyl de 5,13 Å con Lys-353 y de 4,16 Å con Lys-31; una interacción Pi-Pi T-shaped de 5,11 Å con His-34 y una fuerza electrostática de tipo Pi- anión de 3,77 Å con Glu-37.

Se encontraron algunas interacciones moleculares, las que se relacionan directamente con los aminoácidos del docking e interacciones relacionadas con otros aminoácidos. Las interacciones con los aminoácidos del sitio de docking son las principales para la inhibición del receptor hACE2, pero también contribuyen las demás interacciones. Al encontrarse cercanas al sitio de docking tienen la capacidad de ayudar a realizar una unión más fuerte con más interacciones. Existen interacciones que funcionando solas no tienen gran relevancia, pero en un conjunto se puede aumentar la afinidad de unión (**Thafar et al., 2019**).

Al realizar el docking molecular y la selección de los mejores ligandos se tomó en cuenta la afinidad de unión del complejo hACE2/ SARS-CoV-2. Los ligandos fueron elegidos en base a la más baja energía de afinidad, por lo cual son los que se unen con mayor fuerza de todos los ligandos utilizados (**Roy et al., 2015**). De la librería Drug se escogieron 6 ligandos, de la librería Fragment Library se escogieron 5 ligandos y

de la librería Pathogen Box se escogieron 4 ligandos. Al analizar los valores de afinidad de unión, se notó que la librería Fragment Library presentó afinidades más débiles, de la misma forma los ligandos de esta librería fueron los que presentaron menos interacciones con los aminoácidos seleccionados para realizar el docking (Lisina- 31, Glutamato- 35, Aspartato- 38 y Lisina- 353) (B-Rao et al., 2009).

Los resultados obtenidos contrastan la realidad de Fragment Library que presentaron las afinidades más bajas. Al ser esta una librería de fragmentos, es decir, compuestos que forman parte de un conglomerado, únicamente son compuestos que pueden ser utilizados según la funcionalidad que se encuentre para su uso. A diferencia de Drug que está formada completamente por estructuras de fármacos aprobados para su uso y Pathogen Box que tiene compuestos que tienen una utilidad contra enfermedades, pero todavía no han sido aprobados para su uso como medicamento.

Los ligandos con más interacciones con el sitio de docking fueron Amuvatinib (MP-470) y NVP-BHG712, pertenecientes a Drug y MMV688372 (KINETOPLASTIDS), perteneciente a Pathogen Box, todos los ligandos mencionados presentaron seis interacciones.

Mientras que los ligandos con mejor afinidad de unión fueron MMV688372 (KINETOPLASTIDS), MMV687246 (MALARIA), MMV016838 (MALARIA) y MMV688178 (SCHISTOSOMIASIS), los cuatro pertenecientes a Pathogen Box.

La constante de disociación aparente de los ligandos seleccionados se encontró en el rango de 13,74 μ M a 113,24 μ M. Comparando estos valores con la constante de disociación del complejo hACE2/SARS-CoV-2, 14,7 nM, son valores más altos (Huang & Chai, 2020). Tomando en cuenta que solo se realizó el docking en una zona, se esperaba que estos valores no sean iguales a la Kd del complejo.

La utilidad que tiene la presente investigación es determinar la afinidad de los diferentes ligandos, mediante sus valores de afinidad de unión, constante de disociación aparente y las diferentes interacciones intermoleculares, para obtener ligandos que puedan ayudar en la inhibición del virus SARS-CoV-2. Se pueden realizar más docking moleculares para poder llegar a obtener una molécula mejorada que pueda cubrir todo el sitio activo y así obtener un inhibidor que pueda competir contra el virus del SARS-CoV-2.

3.2. Verificación de hipótesis

Se realizaron los estudios bioinformáticos de la enzima convertidora de angiotensina en humanos 2 (hACE2), encontrando posibles inhibidores (ligandos) de una zona del sitio activo de hACE2. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa “Los estudios informáticos de la enzima convertidora de angiotensina en humanos (hACE2) para el desarrollo de posibles inhibidores contra el SARS-CoV-2 son factibles, por lo tanto, se encontraron posibles inhibidores del virus”.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se analizó la enzima convertidora de angiotensina 2 en humanos (hACE2) como receptor de ligandos para el desarrollo de posibles inhibidores contra el SARS-CoV-2, mediante un estudio bioinformático (docking) con tres librerías de compuestos (CASPeR, Chembridge y Pathogen Box), obteniendo que algunos ligandos se pueden unir al sitio seleccionado para el docking.
- Se analizaron datos estructurales y funcionales del ingreso de SARS-CoV-2 al humano mediante el receptor hACE2, encontrando que el virus ingresa mediante la interacción de la proteína Spike con el receptor hACE2. La proteína spike del SARS-CoV-2 cuenta con dos subunidades (S1 y S2). A su vez, la subunidad S1 tiene un dominio de unión al receptor (RDB). La subunidad S1 se encarga del reconocimiento y unión al receptor hACE2, mientras que la subunidad S2 se encarga de la fusión de membranas. Específicamente el ingreso del virus está mediado por la fuerte interacción existente entre la hélice N- terminal del hACE2 y SARS-CoV-2-RBD.
- Se realizaron estudios de docking con el receptor hACE2 contra las librerías CASPeR (Drug), ChemBridge (Fragment Library) y Pathogen Box. Se trabajó con un total de 13981 compuestos (ligandos), de los cuales 3517 pertenecen a CASPeR, 10064 pertenecen a ChemBridge y 400 pertenecen a Pathogen Box. El docking se realizó en el software PyRx. Mediante esta herramienta se determinó la variación de energía (Binding Affinity) existente en la formación del complejo enzima- ligando y con esta información se calculó la constante de disociación aparente (K_{dapp}) para identificar a los ligandos que interactúen con mayor fuerza entre sí en el complejo enzima- ligando. A su vez se identificaron los tipos de interacciones en el complejo enzima- ligando, obteniendo enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas e interacciones con halógenos.

- Se identificaron los inhibidores con mejor interacción con el receptor hACE2. Tras haber realizado el docking con los compuestos (ligandos) de las tres librerías mencionadas, se escogieron 15 compuestos que presentaron una mejor interacción. De los 15 compuestos, 6 pertenecen a la librería CASPeR, 5 pertenecen a Fragment Library, 4 pertenecen a la librería Pathogen Box (Tabla 2). El rango de energía libre de los 15 compuestos se encuentra entre -5,6 y -6,9 kcal/mol. Mientras que la K_{dapp} se encuentra en el rango de 13,74 a 113,24 μM .

4.2. Recomendaciones

- Realizar más estudios de docking en el receptor hACE2, utilizando más aminoácidos del sitio activo o realizando varios docking para encontrar un inhibidor para cada zona seleccionada y así plantear una molécula resultante de la combinación de varios ligandos.
- Para un estudio más específico, tratar de conseguir la Covid Box (Medicines For Malaria Venture) o la Coronavirus Library (ChemBridge) ya que tienen compuestos para realizar estudios contra el virus.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arthur, D., & Uzairu, A. (2019). Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. *Journal of King Saud University - Science*, *31*(4), 1151–1166. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.01.011>
- B-Rao, C., Subramanian, J., & Sharma, S. (2009). Managing protein flexibility in docking and its applications. *Drug Discovery Today*, *14*(7–8), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.01.003>
- Ballester, P., & Mitchell, J. (2010). A machine learning approach to predicting protein–ligand binding affinity with applications to molecular docking. *Bioinformatics*, *26*(9), 1169–1175. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq112>
- Ballón, W., & Grados, R. (2019). Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Rev.Cs.Farm. y Bioq*, *7*(2). http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006
- Berry, M., Fielding, B., & Gamiieldien, J. (2015). Practical Considerations in Virtual Screening and Molecular Docking. In *Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology* (pp. 487–502). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802508-6.00027-2>
- Blasco, M., Navas, C., Martín-Serrano, G., Graña-Castro, O., Lechuga, C., Martín-Díaz, L., Djurec, M., Li, J., Morales-Cacho, L., Esteban-Burgos, L., Perales-Patón, J., Bousquet-Mur, E., Castellano, E., Jacob, H. K. C., Cabras, L., Musteanu, M., Drosten, M., Ortega, S., Mulero, F., ... Barbacid, M. (2019). Complete Regression of Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinomas upon Combined Inhibition of EGFR and C-RAF. *Cancer Cell*, *35*(4), 573–587.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.03.002>

- Brylinski, M. (2018). Aromatic interactions at the ligand-protein interface: Implications for the development of docking scoring functions. *Chemical Biology & Drug Design*, *91*(2), 380–390. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13084>
- Buchwald, P. (2019). A Receptor Model With Binding Affinity, Activation Efficacy, and Signal Amplification Parameters for Complex Fractional Response Versus Occupancy Data. *Frontiers in Pharmacology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00605>
- CASPeR. (2015). *CASPeR*. <https://gc-prd-eskitis.rcs.griffith.edu.au/casper/web/>
- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*, m3862. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>
- Chamsi-Pasha, M., Shao, Z., & Tang, W. H. W. (2014). Angiotensin-Converting Enzyme 2 as a Therapeutic Target for Heart Failure. *Current Heart Failure Reports*, *11*(1), 58–63. <https://doi.org/10.1007/s11897-013-0178-0>
- ChemBridge. (2020). *Fragment Library*. https://www.chembridge.com/screening_libraries/fragment_library/
- Coltell, Ó., Arregui, M., Fabregat, A., & Portolés, O. (2008). La bioinformática en la práctica médica: Integración de datos biológicos y clínicos. *Revista Médica de Chile*, *136*(5). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872008000500015>
- Contreras, F., Terá, L., Barreto, N., de la Parte, M., Simonovis, N., & Velasco, M. (2000). Aspectos Funcionales del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona y Bloqueantes de los Receptores ATI de Angiotensina II en Hipertensión Arterial. *Archivos Venezolanos de Farmacología*, *19*, 121–128. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642000000200009&nrm=iso
- Dannenber, J. (1998). An Introduction to Hydrogen Bonding By George A. Jeffrey (University of Pittsburgh). *Journal of the American Chemical Society*, *120*(22), 5604–5604. <https://doi.org/10.1021/ja9756331>

- Díaz, F., & Toro, A. (2020). SARS-CoV-2/COVID-19: el virus, la enfermedad y la pandemia. *Medicina y Laboratorio*, 24(3), 183–205. <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/05/1096519/covid-19.pdf>
- Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., & Liu, S.-Q. (2016). Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Farmacéuticos. (2020). *Coronavirus: Covid- 19. Informe Técnico*. <https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/Asesoramiento-salud-publica/infeccion-coronavirus-2019-nCoV/Documents/Informe-tecnico-Coronavirus.pdf>
- Garau, C. (2006). *ESTUDIO TEÓRICO DE LAS INTERACCIONES ENTRE ANIONES Y SISTEMAS Pi*. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9451/tcgr1de1.pdf;jsessionid=638ECD3F0B260AEA6453C7473D135000?sequence=1>
- García, C., Maguiña, C., & Raul, G. (2003). Síndrome respiratorio agudo severo (SRAS). *Rev Med Hered*, 14(2), 89–93. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v14n2/v14n2tr1.pdf>
- Gescal, M. (2013). *Introducción a los algoritmos genéticos*. https://www.researchgate.net/publication/237812449_Introduccion_a_los_Algoritmos_Geneticos
- Gómez, F., Silva, H., & Pérez, P. (2010). *Bioinformática: Aplicaciones a la genómica y proteómica*. https://www.researchgate.net/publication/253408324_Bioinformatica_Aplicaciones_en_Genomica_y_Proteomica
- Hernández, J. (2019). *Estudios informáticos de la enzima de Trypanosoma brucei hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa para el uso como target de desarrollo de medicamentos* [Universidad Técnica d Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/30540>

- Huang, Z., & Chai, J. (2020). Door to the cell for COVID-19 opened, leading way to therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 104. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00215-6>
- Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S., & McCray, P. B. (2005). ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. *Journal of Virology*, 79(23), 14614–14621. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005>
- Kastritis, P., & Bonvin, A. (2013). On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(79), 20120835. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0835>
- Keidar, S., Kaplan, M., & Gamliel-Lazarovich, A. (2007). ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1–7). *Cardiovascular Research*, 73(3), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.09.006>
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., ... Penninger, J. M. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nature Medicine*, 11(8), 875–879. <https://doi.org/10.1038/nm1267>
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Lee, M., & Olson, M. (2006). Calculation of Absolute Protein-Ligand Binding Affinity Using Path and Endpoint Approaches. *Biophysical Journal*, 90(3), 864–877. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071589>
- Li, F. (2013). Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antiviral Research*, 100(1), 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.014>

- Li, F., Farzan, M., & Harrison, S. (2005). Structure of SARS Coronavirus Spike Receptor-Binding Domain Complexed with Receptor. *Science*, *309*(5742), 1864–1868. <https://doi.org/10.1126/science.1116480>
- Martínez, J. (2007). La bioinformática como herramienta para la investigación en salud humana. *Salud Pública de México*, *49*(64–66). <https://www.redalyc.org/pdf/106/10649028.pdf>
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, *7*(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- MMV. (2020). *Pathogen Box*. https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/about-pathogen-box?gclid=EAIaIQobChMIwL_X14Pb7QIVESiGCh2TbgAjEAAYASAAEgKTyvD_BwE
- Oliva, J. (2020). SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta, Revista Científica Del Instituto Nacional de Salud*, *3*(2). <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- OMS. (2020). *Coronavirus*. <https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus>
- Pastrian-Soto, G. (2020). Presencia y Expresión del Receptor ACE2 (Target de SARS-CoV-2) en Tejidos Humanos y Cavidad Oral. Posibles Rutas de Infección en Órganos Orales. *International Journal of Odontostomatology*, *14*(4), 501–507. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000400501>
- Prieto, F., & Medina, J. (2018). Diseño de Fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *21*(2), 124–134. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2018/cqb182f.pdf>
- Rabi, F., Al-Zoubi, M., Kasasbeh, G., Salameh, D., & Al-Nasser, A. (2020). SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens*, *9*(3), 231. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>

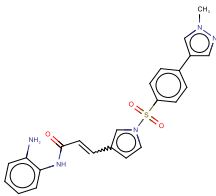
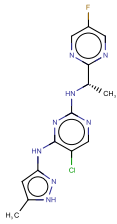
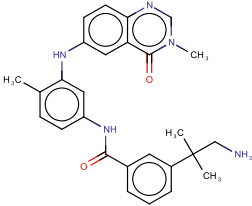
- Ramírez, J. (2014). Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria*, 15(12).
<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/art91.pdf>
- Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). Other Related Techniques. In *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment* (pp. 357–425). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801505-6.00010-7>
- Santeliz, H., Romano, L., Gonzáles, A., & Hernández, H. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*, 19(1), 21–29.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/cardio/h-2008/h081d.pdf>
- Schottel, B. L., Chifotides, H. T., & Dunbar, K. R. (2008). Anion- π interactions. *Chem. Soc. Rev.*, 37(1), 68–83. <https://doi.org/10.1039/B614208G>
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 581(7807), 221–224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
- Soler, M., Lloveras, J., & Batlle, D. (2008). Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina. *Medicina Clínica*, 131(6), 230–236. <https://doi.org/10.1157/13124619>
- Steiner, T., & Koellner, G. (2001). Hydrogen bonds with π -acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 535–557. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4301>
- Thafar, M., Raies, A. Bin, Albaradei, S., Essack, M., & Bajic, V. (2019). Comparison Study of Computational Prediction Tools for Drug-Target Binding Affinities. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00782>
- Tolosa, A. (2020). *Coronavirus SARS-CoV-2: estructura, mecanismo de infección y células afectadas*. Genotipa.
https://genotipia.com/genetica_medica_news/coronavirus-estructura-infeccion-celulas/

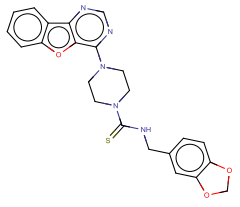
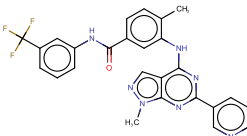
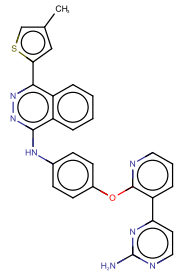
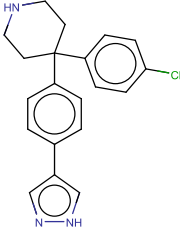
- Totrov, M., & Abagyan, R. (2008). Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: a practical alternative. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.01.004>
- Turner, A. J. (2015). ACE2 Cell Biology, Regulation, and Physiological Functions. In *The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS)* (pp. 185–189). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801364-9.00025-0>
- Wagner, P. (2018). Fisiopatología de la hipertensión arterial: nuevos conceptos. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 64(2), 175–184. <https://doi.org/10.31403/rpgo.v64i2075>
- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K.-Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., & Qi, J. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 181(4), 894-904.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>
- Wevers, B. A., & van der Hoek, L. (2009). Recently Discovered Human Coronaviruses. *Clinics in Laboratory Medicine*, 29(4), 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.07.007>
- Wu, E. (2003). Síndrome respiratorio agudo severo. *Revista Chilena de Pediatría*, 74(4). <https://doi.org/10.4067/S0370-41062003000400002>
- Xiong, X., Qu, K., Ciazynska, K. A., Hosmillo, M., Carter, A. P., Ebrahimi, S., Ke, Z., Scheres, S. H. W., Bergamaschi, L., Grice, G. L., Zhang, Y., Nathan, J. A., Baker, S., James, L. C., Baxendale, H. E., Goodfellow, I., Doffinger, R., & Briggs, J. A. G. (2020). A thermostable, closed SARS-CoV-2 spike protein trimer. *Nature Structural & Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0478-5>
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 367(6485), 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>

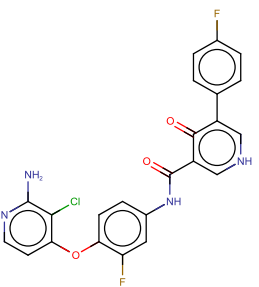
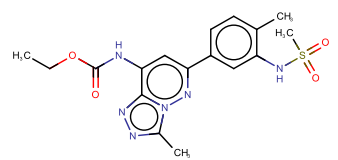
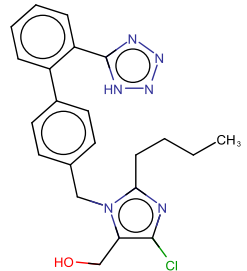
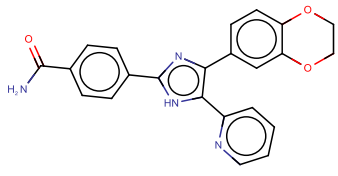
Zheng, L., Alhossary, A. A., Kwoh, C.-K., & Mu, Y. (2019). Molecular Dynamics and Simulation. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 550–566). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20284-7>

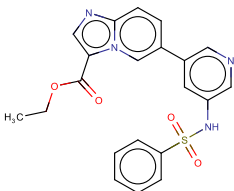
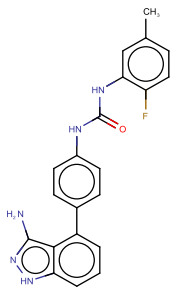
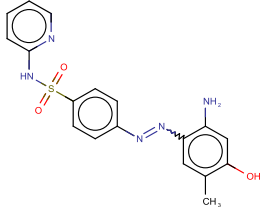
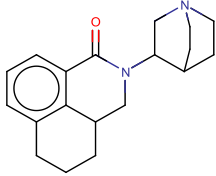
ANEXOS

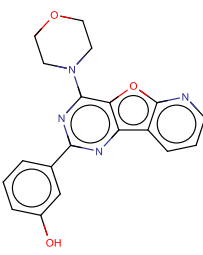
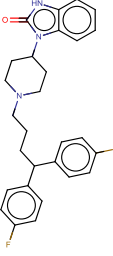
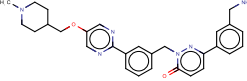
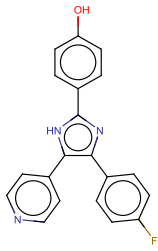
Anexo 1. Resultados de los Binding Affinity de Drug (CASPeR)

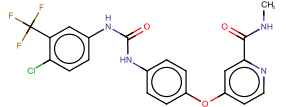
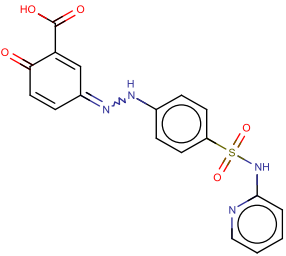
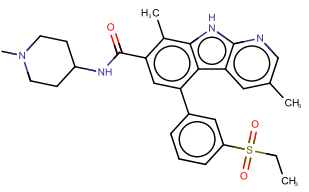
No.	Ligando	Estructura	Binding Affinity (kcal/mol)								
			Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6	Model 7	Model 8	Model 9
1	4SC-202		-6,1	-5,7	-5,6	-4,9	-4,7	-4,6	-4,50	-4,4	-4,3
2	AZD1480		-6,2	-5,8	-5,7	-5	-4,7	-4,4	-4,1	-4	-4
3	AZ 628		-6,00	-5,5	-5,3	-4,7	-4,5	-4,4	-3,7	-3,4	-3,1

4	Amuvatinib (MP-470)		-6,00	-5,8	-5,5	-5,4	-3,9	-3,2	-	-	-
5	NVP-BHG712		-6,5	-6,4	-5,8	-5,8	-5,7	-5,6	-4,5	-3,9	-3,9
6	AMG-900		-5,8	-4,2	-4	-3,3	-3,2	-	-	-	-
7	AT7867		-5,8	-5,4	-5,1	-4,9	-4,5	-4,3	-3,7	-	-

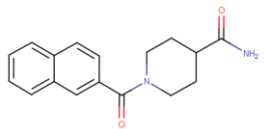
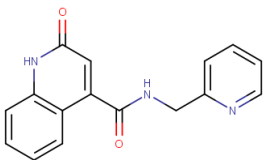
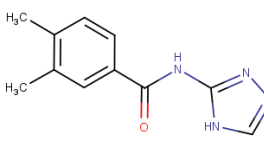
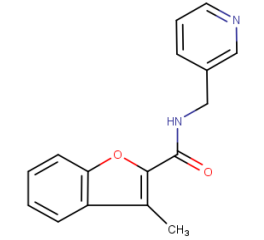
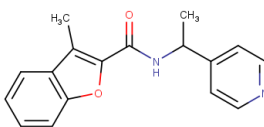
8	BMS-794833		-5,8	-5,4	-4,9	-4,9	-4,5	-3,9	-3,7	-3,4	-
9	Bromosporine		-5,8	-5,3	-5,2	-4,4	-4,4	-4	-3,2	-3,1	-
10	LOSARTAN		-5,9	-5,2	-5	-	-	-	-	-	-
11	D 4476		-5,8	-5,2	-4,9	-4,1	-2,9	-	-	-	-

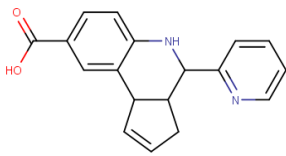
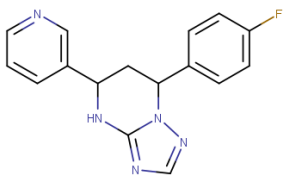
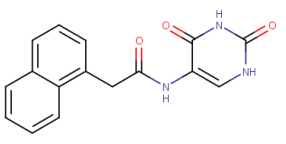
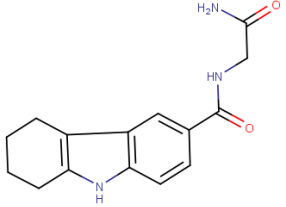
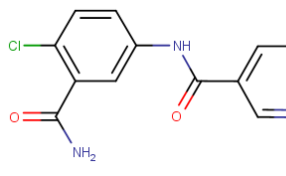
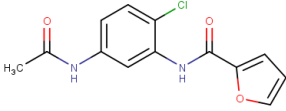
12	HS-173		-5,8	-5,4	-5,1	-4,2	-3,7	-	-	-	-
13	Linifanib (ABT-869)		-5,9	-5,4	-5,4	-5,2	-5,2	-5,1	-5	-5	-4,9
14	MS436		-5,8	-5,7	-5,2	-5	-5	-5	-4,9	-4,8	-4,7
15	PALONOSETR ON HCl		-5,8	-5,5	-4,9	-4,6	-4,5	-4,4	-4,4	-4,2	-4,1

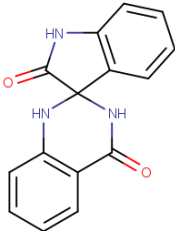
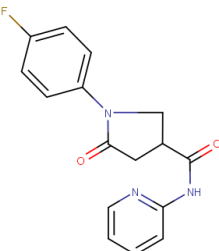
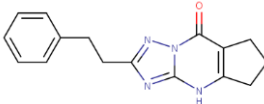
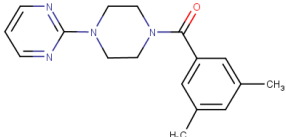
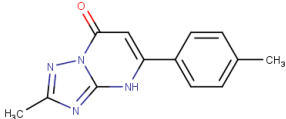
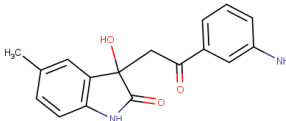
16	PI-103		-5,8	-5,8	-5,7	-5,6	-5,4	-5,4	-5,3	-5,2	-4,8
17	PIMOZIDE		-5,9	-5,8	-5,5	-5,4	-5,3	-5,3	-5,2	-5	-4,9
18	Tepotinib (EMD 1214063)		-5,9	-5,6	-4,4	-4,4	-4,2	-4,2	-3,9	-3,8	-3,3
19	SB202190 (FHPI)		-5,8	-5,6	-5,4	-5,4	-5,3	-4,8	-4,7	-4,5	-4,5

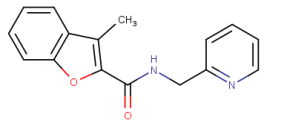
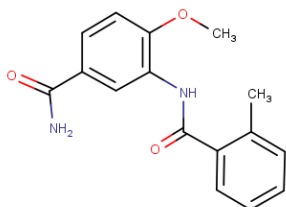
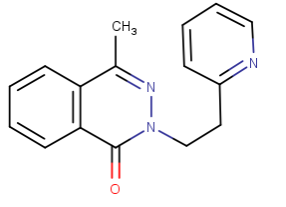
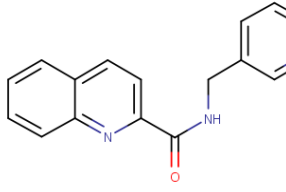
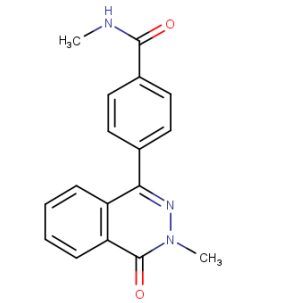
20	SORAFENIB		-5,8	-5,3	-5,2	-5	-4,9	-4,9	-4,9	-4,8	-4,8
21	SULFASALAZINE		-5,8	-5,8	-5,7	-5,6	-5,3	-5,3	-5,1	-5	-4,9
22	TAK-901		-5,8	-5,8	-5,5	-5,3	-5,1	-4,8	-4,7	-4	-3,8

Anexo 2. Resultados de los Binding Affinity de Fragment Library (ChemBridge)

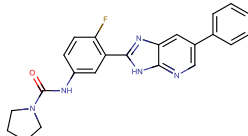
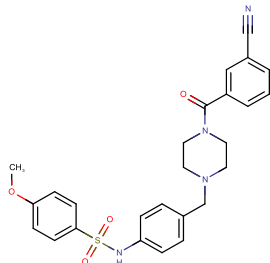
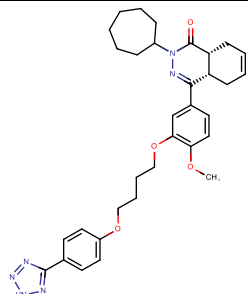
No.	Ligando	Estructura	Binding Affinity (kcal/mol)								
			Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6	Model 7	Model 8	Model 9
1	1-(2-naphthoyl)-4-piperidinecarboxamide		-5,6	-5,3	-4,6	-4,6	-4,4	-4,2	-4,1	-3,8	-2,8
2	2-oxo-N-(2-pyridinylmethyl)-1,2-dihydro-4-quinolinecarboxamide		-5,6	-5,3	-5,3	-4,9	-4,6	-4,4	-4,4	-4,1	-4
3	3,4-dimethyl-N-4H-1,2,4-triazol-3-ylbenzamide		-5,5	-5,4	-5,1	-4,5	-4,4	-4,2	-4	-3,9	-3,7
4	3-methyl-N-(3-pyridinylmethyl)-1-benzofuran-2-carboxamide		-5,6	-4,9	-4,7	-4,5	-4,1	-3,8	-3,7	-3,6	-3,6
5	3-methyl-N-[1-(4-pyridinyl)ethyl]-1-benzofuran-2-carboxamide		-5,5	-5,3	-5,1	-4,9	-4,8	-4,7	-4,6	-4,4	-4,3

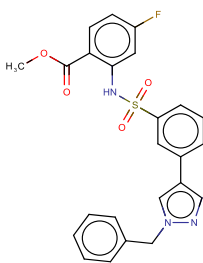
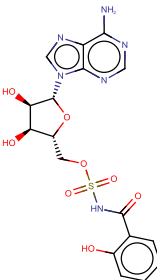
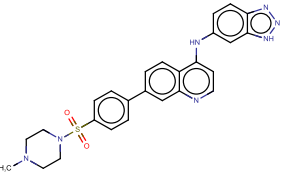
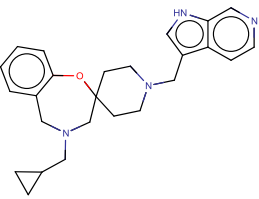
6	4-(2-pyridinyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-8-carboxylic acid		-5,5	-4,8	-4,6	-4,4	-4,3	-4,2	-3,5	-3,5	-3,3
7	7-(4-fluorophenyl)-5-(3-pyridinyl)-4,5,6,7-tetrahydro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine		-5,8	-5,1	-5,1	-5	-5	-5	-5	-4,8	-4,8
8	N-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)-2-(1-naphthyl)acetamide		-5,5	-5,2	-5,1	-5	-5	-4,9	-4,8	-4,7	-4,7
9	N-(2-amino-2-oxoethyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-6-carboxamide		-5,8	-5,5	-4,8	-4,8	-4,7	-4,7	-4,7	-4,3	-4,3
10	N-[3-(aminocarbonyl)-4-chlorophenyl]nicotinamide		-5,5	-4,7	-4,6	-4,6	-4,4	-4,4	-3,8	-3,2	-3,2
11	N-[5-(acetylamino)-2-chlorophenyl]-2-furamide		-5,5	-4,8	-4,6	-4,5	-4,5	-4,3	-4,2	-3,8	-3,3

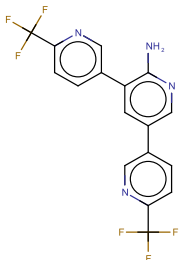
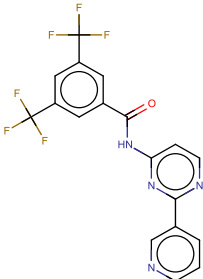
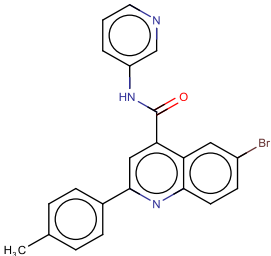
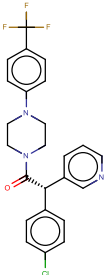
12	1'H-spiro[indole-3,2'-quinazoline]-2,4'(1H,3'H)-dione		-5,4	-3,8	-3,7	-3	-2,7	-2,6	-2,5	-	-
13	1-(4-fluorophenyl)-5-oxo-N-2-pyridinyl-3-pyrrolidinecarboxamide		-5,4	-4,7	-4,6	-4,4	-4,4	-4,4	-4,3	-4,2	-3,9
14	2-(2-phenylethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-8H-cyclopenta[d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-8-one		-5,4	-5,2	-5,1	-4,9	-4,4	-3,8	-3,7	-3,4	-
15	2-[4-(3,5-dimethylbenzoyl)-1-piperazinyl]pyrimidine		-5,4	-5,2	-4,8	-4,8	-4,6	-4,2	-4,2	-4	-3,9
16	2-methyl-5-(4-methylphenyl)[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one		-5,4	-4,8	-4,8	-4,7	-4,7	-4,3	-4,3	-4	-3,6
17	3-[2-(3-aminophenyl)-2-oxoethyl]-3-hydroxy-5-methyl-1,3-dihydro-2H-indol-2-one		-5,4	-4,7	-4,6	-4,6	-4,5	-4,4	-4,4	-4,1	-4,1

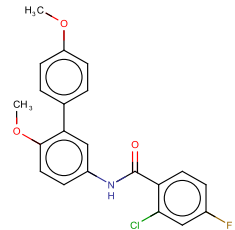
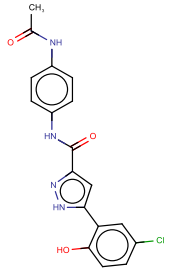
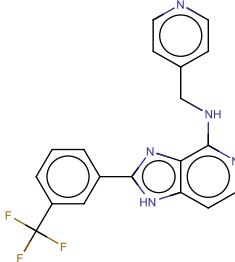
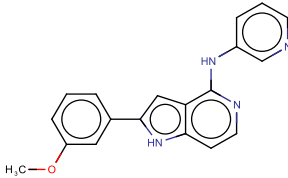
18	3-methyl-N-(2-pyridinylmethyl)-1-benzofuran-2-carboxamide		-5,4	-5	-4,4	-4,1	-4	-3,9	-3,7	-3,6	-3,6
19	4-methoxy-3-[(2-methylbenzoyl)amino]benzamide		-5,4	-5,1	-4,9	-4,7	-4,6	-4,6	-4,3	-4,3	-4,3
20	4-methyl-2-[2-(2-pyridinyl)ethyl]-1(2H)-phthalazinone		-5,4	-5,1	-5,1	-5	-4,9	-4,8	-4,7	-4,7	-4,5
21	N-(3-pyridinylmethyl)-2-quinolinecarboxamide		-5,4	-5,3	-4,8	-4,6	-4,6	-4,5	-4,3	-4	-3,9
22	N-methyl-4-(3-methyl-4-oxo-3,4-dihydro-1-phthalazinyl)benzamide		-5,4	-5,4	-5,3	-4,8	-4,7	-4,5	-4,3	-3,8	-3,4

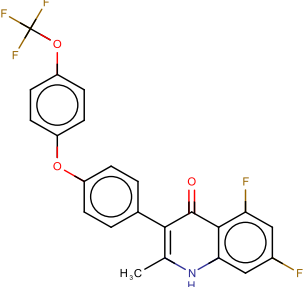
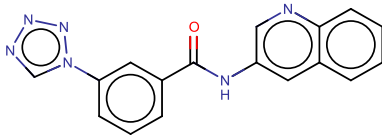
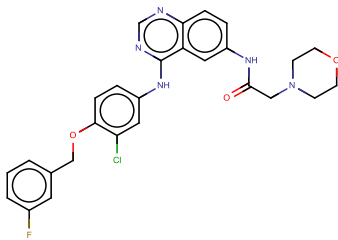
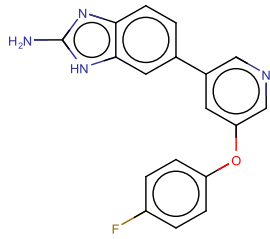
Anexo 3. Resultados de los Binding Affinity de Pathogen Box

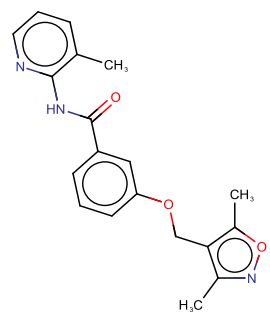
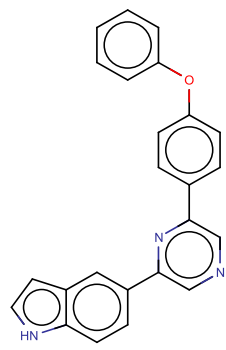
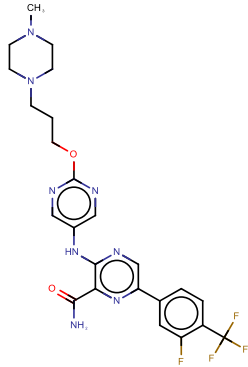
No.	Compund ID	Disease Set	Estructura	Binding Affinity (kcal/mol)								
				Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6	Model 7	Model 8	Model 9
1	MMV688372	KINETOPLASTIDS		-6,9	-6,4	-5,8	-5,8	-5,7	-5,6	-5,4	-5,2	-5,2
2	MMV689029	KINETOPLASTIDS		-6,5	-5,1	-5	-5	-4,9	-4,9	-4,6	-4,6	-4,5
3	MMV690027	KINETOPLASTIDS		-6	-5,7	-5,4	-5,3	-5,2	-5,1	-4,9	-4,8	-4,8

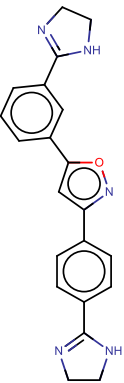
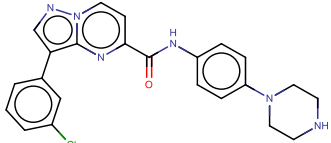
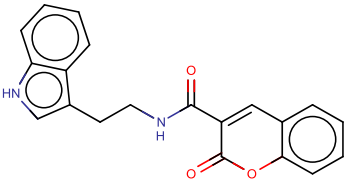
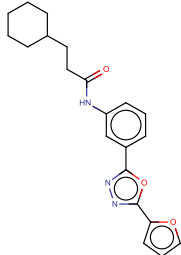
4	MMV688350	DENGUE		-6,1	-6	-5,9	-5,6	-5,6	-5,5	-5,4	-5,4	-5,1
5	MMV687700	TUBERCULOSIS		-6	-5,7	-5,6	-5,3	-5,2	-5,2	-5,1	-5	-5
6	MMV687246	MALARIA		-6,7	-6,1	-6	-5,8	-5,5	-5,3	-5,2	-5,1	-5,1
7	MMV023183	MALARIA		-6,2	-5,8	-5,7	-5,7	-5,6	-5,4	-5,2	-5,1	-4,8

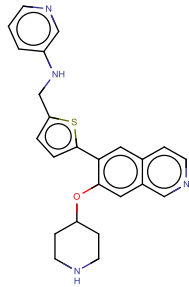
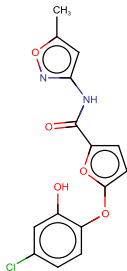
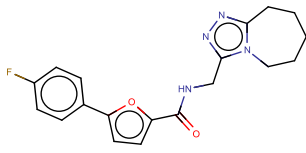
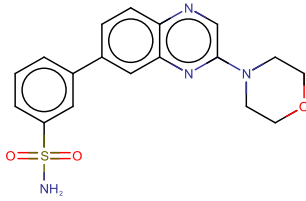
8	MMV668727	ONCHOCERCIASIS		-6,2	-5,6	-5,3	-5,3	-5,3	-5	-4,4	-4,4	-4,3
9	MMV019838	MALARIA		-6,2	-6,2	-6	-5,9	-5,8	-5,6	-5,6	-5,5	-5,3
10	MMV016838	MALARIA		-6,7	-6	-5,6	-5,5	-5,4	-5,4	-5,1	-4,9	-4,7
11	MMV689244	KINETOPLASTIDS		-6	-5,6	-5,2	-5,2	-4,6	-4,5	-4,5	-4,5	-4,4

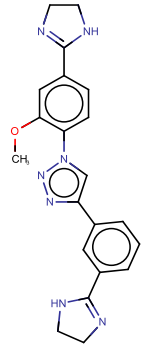
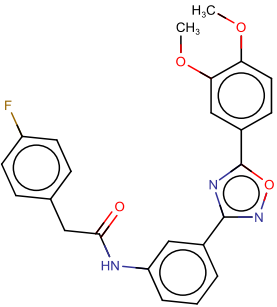
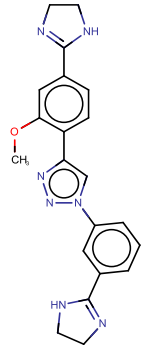
12	MMV676526	TUBERCULOSIS		-6	-5,6	-5,4	-5,2	-5,1	-5,1	-5	-4,9	-4,9
13	MMV676380	MAARIA		-6	-5,4	-5,4	-5,3	-5,2	-5,1	-4,9	-4,8	-4,8
14	MMV032967	MALARIA		-6,1	-6,1	-5,9	-5,9	-5,6	-5,5	-5,2	-5,1	-5,1
15	MMV392832	MALARIA		-6	-5,6	-5,4	-5,2	-5,2	-5,1	-5,1	-5,1	-5

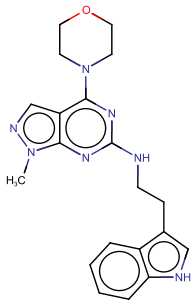
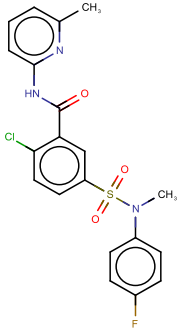
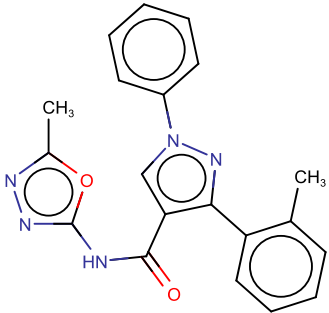
16	MMV671636	ONCHOCERCIASIS		-6,1	-5,9	-5,7	-5,5	-5,4	-5,3	-5	-4,9	-4,9
17	MMV084864	MALARIA		-6,2	-6,1	-6	-6	-5,8	-5,4	-5,4	-5,3	-5,2
18	MMV688274	KINETOPLASTIDS		-6,2	-5,9	-5,9	-5,6	-5,6	-5,4	-5,4	-5,1	-5
19	MMV687248	TUBERCULOSIS		-6	-5,6	-5,5	-5,4	-5,4	-5,4	-5,4	-5,3	-5,3

20	MMV688793	KINETOPLASTIDS		-6	-5,9	-5,7	-5,4	-5,3	-5,3	-5,3	-5,2	-5,1
21	MMV688178	SCHISTOSOMIASIS		-6,9	-6,7	-6,1	-6	-6	-5,9	-5,8	-5,8	-5,7
22	MMV687812	TUBERCULOSIS		-6,1	-5,7	-5,5	-5,2	-4,9	-4,4	-4,3	-4,2	-3,8

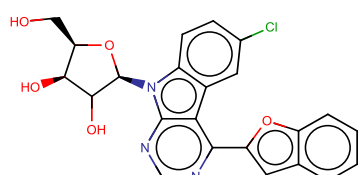
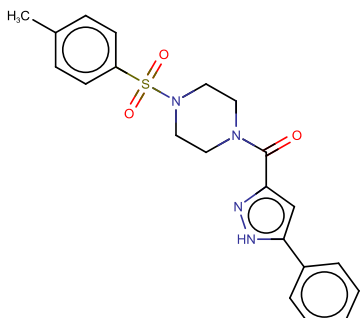
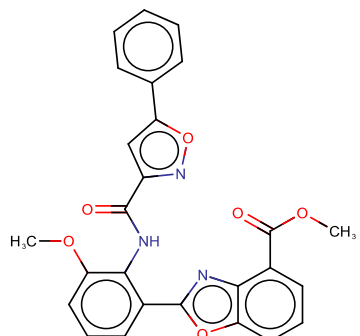
23	MMV688361	KINETOPLASTIDS		-6,1	-6	-5,6	-5,5	-5,4	-5,4	-5,3	-5,3	-5,2
24	MMV022478	MALARIA		-6,5	-6,1	-5,7	-5,6	-5,5	-5,5	-5,4	-5,3	-5,2
25	MMV676539	TUBERCULOSIS		-6,3	-5,7	-5,6	-5,4	-5,3	-5,2	-5,2	-5,1	-5
26	MMV676589	TUBERCULOSIS		-6,1	-6,1	-5,8	-5,8	-5,7	-5,7	-5,7	-5,6	-5,6

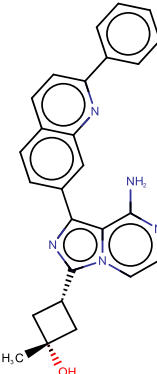
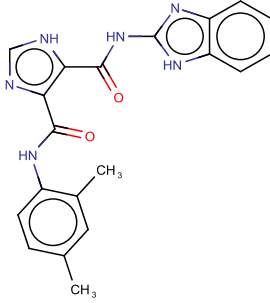
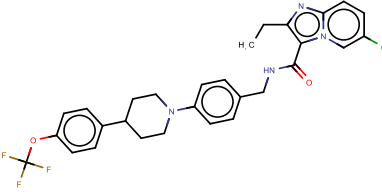
27	MMV023969	TUBERCULOSIS		-6,2	-6	-5,9	-5,7	-5,2	-5,2	-5	-5	-4,9
28	MMV688955	TOXOPLASMOSIS		-6,1	-5,7	-5,3	-5,3	-5,3	-5,2	-4,7	-4,6	-4,5
29	MMV688796	KINETOPLASTIDS		-6,4	-5,9	-5,8	-5,8	-5,7	-5,6	-5,6	-5,3	-5,1
30	MMV023860	MALARIA		-6,2	-5,9	-5,7	-5,5	-5,5	-5,5	-5,3	-5,2	-5,1

31	MMV688474	KINETOPLASTIDS		-6	-5,8	-5,5	-5,3	-5,2	-5,2	-52	-5	-5
32	MMV676571	TUBERCULOSIS		-6,6	-6,5	-6,3	-6,1	-6,1	-5,8	-5,6	-5,5	-5,4
33	MMV688407	KINETOPLASTIDS		-6	-6	-5,9	-5,7	-5,7	-5,5	-5,5	-5,4	-5,4

34	MMV676382	SCHISTOSOMIASIS		-6	-5,7	-5,6	-5,5	-5,4	-5,3	-5,3	-5,3	-5,3	-5,1
35	MMV676528	MALARIA		-6	-5,9	-5,7	-5,6	-5,5	-5,5	-5,2	-5,2	-5,2	-5,1
36	MMV020320	MALARIA		-6	-5,9	-5,5	-5,4	-5,3	-5,2	-5,1	-4,9	-4,9	-4,9

37	MMV676008	KINETOPLASTIDS		-6,2	-6,1	-5,7	-5,6	-5,5	-5,4	-5,4	-5,3	-5,3
38	MMV688415	KINETOPLASTIDS		-6	-5,5	-5,3	-5,2	-5,1	-5	-4,9	-4,8	-4,7
39	MMV688364	TOXOPLASMOSIS		-6,6	-6,4	-6,3	-6,2	-5,8	-5,7	-5,4	-5,4	-5,4

40	MMV688921	DENGUE		-6	-5,6	-5,3	-5,2	-5,1	-4,7	-4,6	-4,6	-4,5
41	MMV019742	MALARIA		-6,5	-6,4	-5,7	-5,2	-5,1	-4,9	-4,9	-4,9	-4,8
42	MMV676186	KINETOPLASTIDS		-6,1	-5,6	-5,6	-5,4	-5,1	-5	-5	-4,9	-4,9

43	MMV676605	MALARIA		-6,1	-6,1	-6,1	-6	-5,8	-5,7	-5,3	-5,3	-5,2
44	MMV011903	MALARIA		-6,1	-6	-5,9	-5,8	-5,8	-5,6	-5,4	-5,4	-5
45	MMV687696	TUBERCULOSIS		-6	-5,9	-5,6	-5,4	-5,4	-5,3	-5,3	-5,1	-5